

09/807132

PCT/JP99/05578

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

08.10.99

REC'D 26 NOV 1999

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1998年10月 9日

出 願 番 号  
Application Number:

平成10年特許願第288565号

出 願 人  
Applicant(s):

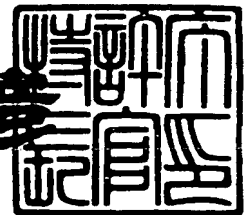
株式会社中外分子医学研究所

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17 I(a) OR (b)

1999年11月12日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3077974

【書類名】 特許願

【整理番号】 C2-009

【提出日】 平成10年10月 9日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明の名称】 新規G蛋白質結合型受容体

【請求項の数】 16

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

    【氏名】 前田 正嗣

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

    【氏名】 中田 靖彦

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

    【氏名】 野村 仁

【特許出願人】

    【識別番号】 596102791

---

    【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

    【代表者】 大杉 義征

【代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

    【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716403

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規 G 蛋白質結合型受容体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：4 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

【請求項 2】 配列番号：5 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

【請求項 3】 配列番号：6 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

【請求項 4】 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードする蛋白質であって、配列番号：4 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

【請求項 5】 配列番号：2 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードする蛋白質であって、配列番号：5 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

---

【請求項 6】 配列番号：3 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードする蛋白質であって、配列番号：6 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

【請求項 7】 請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質と他のペプチド又はポリペプチドとからなる融合蛋白質。

【請求項 8】 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする DNA。

【請求項 9】 請求項 8 に記載の DNA が挿入されたベクター。

【請求項 10】 請求項 8 に記載の DNA を発現可能に保持する形質転換体

【請求項 11】 請求項 10 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項 12】 請求項 1～7 に記載の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質に被験試料を接触させる工程、および

(b) 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 13】 請求項 1～7 に記載の蛋白質に結合するリガンドおよび／またはアゴニストをスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質を表面に発現させた細胞に被験試料を接触させる工程、

(b) 該細胞内の生化学的変化を測定する工程、および

(c) 該細胞内の生化学的変化を誘導する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 14】 請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質に対して特異的に結合する抗体。

【請求項 15】 請求項 14 に記載の抗体と、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質との免疫複合体の生成を検出又は測定することを含んでなる、該蛋白質の検出又は測定方法。

【請求項 16】 配列番号：1 から 3 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA と特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有する DNA

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】

【0001】

本発明は、新規な G 蛋白質結合型受容体蛋白質およびその遺伝子、並びにそれ

らの製造および用途に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

これまでに、Olfactory受容体(OR)遺伝子ファミリーは生体の嗅覚応答機構を司るOdorant受容体をコードしている多重遺伝子ファミリーとして知られている。同遺伝子の発見は、1991年にラットの嗅覚感作神経細胞での発現が観察された報告(Buck, L. et al. Cell 65, 175-187, 1991)が最初のもので、その後、イヌ(Permentier, M. et al. Nature 355, 453-455, 1992)、マウス(Ressler, K.J. et al. Cell 73, 597-609, 1993)、ヒト(Selbie, L.A. et al. Mol. Brain Res. 13, 159-163, 1992)、ナマズ(Ngai, J. et al. Cell 72, 657-666, 1993)、カエル(Freitag, J. et al. Neuron 15, 1383-1392, 1995)においても生物種を越え、相次いで相同遺伝子群が見出されている。同遺伝子群がコードする受容体蛋白質は、他のG蛋白質結合型受容体サブファミリーと同様に7回膜貫通型の構造的特徴を持ち、共通して第1細胞外領域に糖修飾を受ける[N-x-S / T] (xは任意のアミノ酸)モチーフが存在する。また、第2細胞外領域(ループ-1)と第3細胞外領域(ループ-2)は、互いの保存されたシステイン残基によりジスルフィド結合で架橋されている。さらに機能的にも重要であることが予測される共通モチーフは、第2細胞内領域の[M-A-Y-D-R-Y-L/V-A-I/V-C]配列で、特にこの[D-R-Y]モチーフが、細胞内のG蛋白質との結合に不可欠であることが示唆されている(Rosenthal, W. et al. J. Biol. Chem. 268, 13030-13033, 1993、Marchese, A. et al. Genomics 23, 609-618, 1994)。

#### 【0003】

一方、Odorant受容体群に対するリガンドに関しては、例えばodourリガンドや神経ペプチド様の存在が推測されてはいるが、現在のところ全く不明である(Buck, L. et al. Cell 65, 175-187, 1991、Nagai, J. et al. Cell 72, 657-666, 1993)。また、そのシグナル伝達についても、G蛋白質との結合が指摘されている以外は、ほとんど知見はなく、今後の機能解析が望まれている。最近になって構造的親近性より、同遺伝子群の全体を大きく8種類のサブファミリーに分類することが提唱されてはいるが、それが必ずしも機能的分類との相関性を決定で

きるとは考え難い。また、ヒトにおいて同遺伝子群は、約1000コピー近く存在することが予測されているにもかかわらず、そのうち約70%は偽遺伝子であることが推定されている (Sylvie, R. et al. Nature Gen. 18, 243-250, 1998)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規なG蛋白質結合型受容体蛋白質およびその遺伝子、それらの製造方法および該製造などに用いられる分子、並びにそれらの用途を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

Blast 検索により、GenBank の nr データベースから新規な複数の7回膜貫通型G蛋白質結合型受容体遺伝子を含むヒトゲノム配列を見出した。このゲノム配列に基づき設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いた RT-PCRを、ヒト各臓器由来の mRNA を鋳型として実施することにより、これら標的遺伝子の部分cDNA配列を得ると同時に、各臓器におけるこれら遺伝子の発現分布、及び発現様態を評価した。その後さらにRT-PCRの結果、高い遺伝子発現が認められたヒト精巣由来の cDNA ライブラリーを鋳型として用いた、5' -RACE 法及び3' -RACE 法を実施することで、これら遺伝子の完全長cDNAの単離に成功した。単離された3つの遺伝子をそれぞれGTAR14-1、GTAR14-3、およびGTAR14-5と命名した。

【0006】

これら遺伝子は新規7回膜貫通型G蛋白質結合型受容体をコードし、既知のOlfactory 受容体(OR)遺伝子ファミリーの特徴を満足させるものであった。これら遺伝子のヒト各臓器での発現分布を解析した結果、GTAR14-1は、胸腺、脾臓といったリンパ造血系、及び精巣と脾臓において特に強く検出された。また、胎児胸腺において発現が認められた。また、GTAR14-3は、胸腺、及び精巣において特に強く検出された。また、小腸、結腸などの消化管や、胎盤や前立腺などのホルモン分泌系においても遺伝子発現が認められ、幅広い発現組織分布を示した。GTAR14-5においては、胸腺、脾臓、末梢白血球といったリンパ造血系、及び精巣において特に強く検出された。また、胎児胸腺、胎児脾臓、胎児肺でも発現増強が認

められた他、胎児脳と胎児腎臓においても弱い遺伝子発現が認められた。

【0007】

この発現特性等から、これら遺伝子がコードする蛋白質は、リンパ造血系や内分泌系で重要な機能を担うことが予測され、新規造血性ペプチド因子や新規ホルモン様ペプチド因子の検索に利用しうると考えられた。

【0008】

本発明は、新規なG蛋白質結合型受容体蛋白質およびその遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、

(1) 配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質、

(2) 配列番号：5に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質、

(3) 配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質、

(4) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質、

(5) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：5に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質、

(6) 配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質、



(7) (1)～(6)のいずれか1項に記載の蛋白質と他のペプチド又はポリペプチドとからなる融合蛋白質、

(8) (1)～(7)のいずれか1項に記載の蛋白質をコードするDNA、

(9) (8)に記載のDNAが挿入されたベクター、

(10) (8)に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体、

(11) (10)に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1)～(7)のいずれか1項に記載の蛋白質の製造方法、

(12) (1)～(7)に記載の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) (1)～(7)のいずれか1項に記載の蛋白質に被験試料を接触させる工程、および

(b) (1)～(7)のいずれか1項に記載の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、

(13) (1)～(7)に記載の蛋白質に結合するリガンドおよび／またはアゴニストをスクリーニングする方法であって、

(a) (1)～(7)のいずれか1項に記載の蛋白質を表面に発現させた細胞に被験試料を接触させる工程、

(b) 該細胞内の生化学的変化を測定する工程、および

(c) 該細胞内の生化学的変化を誘導する化合物を選択する工程、を含む方法、

(14) (1)～(6)のいずれか1項に記載の蛋白質に対して特異的に結合する抗体、

---

(15) (14)に記載の抗体と、(1)～(7)のいずれか1項に記載の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質との免疫複合体の生成を検出又は測定することを含んでなる、該蛋白質の検出又は測定方法、

(16) 配列番号：1から3のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNA、を提供するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】 本発明者らにより単離されたGTAR14-1 cDNA、GTAR14-3 cDNA、GTAR14-5 cDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号：1、2、3に、またこれらcDNAによりコードされる蛋白質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：4、5、6に示す。

【0010】

OR 遺伝子ファミリーに属する受容体蛋白質は、他のG蛋白質結合型受容体蛋白質と同様に、7回膜貫通型の構造的特徴を持ち、共通して第1細胞外領域に糖修飾を受ける[ N-x-S / T ] (x は任意のアミノ酸) モチーフを有する、また、第2細胞外領域(ループ-1)と第3細胞外領域(ループ-2)には、ジスルフィド結合による架橋のための保存されたシステイン残基、さらにG蛋白質との結合に不可欠であることが示唆されている、第2細胞内領域の[ M-A-Y-D-R-Y-L/V-A-I/V-C ] 配列(特に該配列内の[ D-R-Y ] モチーフ)を有している(Rosenthal, W. et al. J. Biol. Chem. 268, 13030-13033, 1993、Marchese, A. et al. Genomics 23, 609-618, 1994)。

【0011】

本発明者らにより単離された上記3つの遺伝子がコードする蛋白質(以下、「GTAR14蛋白質」と称する)は、細胞膜蛋白質であり、その配列中に7箇所の疎水性膜貫通領域を保有する7回膜貫通型受容体である。

【0012】

また、GTAR14蛋白質は、既知のOdorant受容体同様に、上記のG蛋白質結合型受容体蛋白質に特徴的なモチーフを有する。即ち、GTAR14-1蛋白質、GTAR14-3蛋白質、およびGTAR14-5蛋白質は、第1細胞外領域に糖修飾を受ける[ N-x-S/T ] モチーフ(x は任意のアミノ酸)として、それぞれ[ N-Q-T ]、[ N-S-T ]、[ N-T-S ] という配列を有し、また共通して、第2細胞外領域(ループ-1)と第3細胞外領域(ループ-2)の保存されたシステイン残基を有していた。さらに、G蛋白質との結合に不可欠であることが示唆されている第2細胞内領域の[ M-A-Y-D-R-Y-L/V-A-I/V-C ] 配列として、それぞれ[ V-A-Y-D-R-Y-V-A-I-C ]、[ M-A-Y-D-R-Y-L-A-I-C ]、[ M-A-Y-D-R-Y-L-A-I-C ] の配列を有していた。

【0013】

これらの特徴から、GTAR14蛋白質は、他のG蛋白質結合型受容体蛋白質と同様に、細胞外からのリガンド刺激に応答して、細胞内のG蛋白質と結合することによりその機能を発現していると考えられる。

【0014】

また、RT-PCRによる発現解析により、GTAR14遺伝子は、特に胸腺と精巣において強い発現が観察された（実施例3、図7から9）。この事実は、これらGTAR14蛋白質が特定集団のリンパ球細胞群における分化調節や、増殖及び活性化調節を担っている可能性を示唆するものである。これは即ち、GTAR14蛋白質が、リガンド刺激に応答し、G蛋白質との相互作用を介することによって、リンパ球に特徴的な活性の調節を司る、中枢分子として機能し得ることを強く示唆している。また、常に細胞周期が回転しており、いわゆる周期ターンオーバーの速い精巣の特質を考えると、これら蛋白質が細胞周期や分裂を機能制御し得る可能性も予測される。

【0015】

一方、GTAR14-1遺伝子の発現は、造血細胞を含むと予測される、脾臓でも認められた。また、GTAR14-5遺伝子の発現も、造血細胞を含むと予測される、脾臓や末梢白血球において認められた。このことは、構造的に既知Odorant受容体と類似性を示すGTAR14-1蛋白質およびGTAR14-5蛋白質が、新規造血調節因子受容体として機能し得る可能性を示唆するものである。

【0016】

GTAR14-3遺伝子に関しては、上記の胸腺、精巣以外に、小腸、結腸などの消化管や、胎盤、前立腺といった内分泌系でも遺伝子発現が認められた。さらに、ヒト胎児臓器由来のmRNAにおいては、胸腺、脳、心臓、平滑筋、及び腎臓で強いPCR産物の増幅が認められ、また、胎児肝臓と胎児肺においても弱い遺伝子発現が認められ、幅広い発現組織分布を示した。このことは、GTAR14-3蛋白質が新規造血因子受容体として機能し得る可能性を示唆するのみならず、新規ホルモン様ペプチド分子受容体として、多岐にわたる生理機能を制御し得る可能性を強く示唆している。

【0017】

免疫担当細胞において中枢的機能責任を担いうるGTAR14蛋白質には、以下の疾患領域における臨床応用が考えられる。

【0018】

まず、第一にGTAR14蛋白質に機能結合しうる、生体由来のリガンドやアゴニスト、あるいはGTAR14蛋白質の機能を活性化しうる特異的抗体の生体投与により、GTAR14蛋白質の活性亢進を促すことによって、生体の細胞性免疫を増強しうると予測される。即ち、上記のような機能結合物質は免疫担当細胞、中でも特にT細胞群の増殖促進剤、分化促進剤、あるいは免疫細胞機能活性化剤としての臨床応用が可能である。これは即ち、腫瘍免疫や感染免疫といった生体免疫応答の促進を意味するものであり、具体的には、ある特定種の癌組織に対する細胞障害性免疫を高めることが可能であり、また、感染症に対する生体の免疫抵抗性を高めることで、HCVやHIVといった各種ウイルス感染に対する抵抗力の増強を誘導しうる。

【0019】

第二にGTAR14蛋白質に機能結合しうる、アンタゴニストやその他の阻害剤、あるいはGTAR14蛋白質の機能を阻害しうる特異的抗体の生体投与により、GTAR14蛋白質の活性阻害を促すことによって、生体の細胞性免疫を抑制しうると予測される。即ち、このような阻害物質は免疫担当細胞、中でも特にT細胞群の増殖抑制剤、分化促進剤、あるいは免疫細胞機能活性化剤としての臨床応用が可能である。これは即ち、自己組織傷害性が起因する自己免疫疾患発生の抑制や、移植免疫の領域において最大の問題となる、生体免疫による組織拒絶応答の抑制を意味するものであり、具体的には、糖尿病や肝傷害、コラーゲン関節炎、GVHD、EAEといった免疫応答の異常亢進により誘導された疾患領域に対して、極めて有効であると考えられる。あるいは、金属や花粉などに対する種々の抗原特異的アレルギーに対しても、上記阻害剤による免疫抑制による解決が有効であると考えられる。

【0020】

本発明はまた、上記GTAR14蛋白質と機能的に同等な蛋白質も包含する。本発明において「機能的に同等」とは、蛋白質が、GTAR14蛋白質と同等の生物学的活性

を有することを指す。生物学的活性としては、例えば、G蛋白質結合型受容体蛋白質活性、即ち、リガンド刺激に応答して細胞内のG蛋白質と相互作用することにより、細胞外から細胞内へのシグナル伝達を行う活性である。

【0021】

このような蛋白質を得るための方法としては、蛋白質のアミノ酸配列に変異を導入する方法が用いられている。例えば、合成オリゴヌクレオチドプライマーを利用した部位特異的変異誘発法により、蛋白質中のアミノ酸配列に所望の変異を導入することができる (Kramer, W. and Fritz, H. J. *Methods in Enzymol.* (1987) 154, 350-367)。また、PCRによる部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL製) を使用して、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入することもできる。これらの方法により、GTAR14蛋白質 (配列番号: 4 から 6) において、その生物学的活性に影響を与えないよう、1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾された、GTAR14蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることができる。

【0022】

GTAR14蛋白質と機能的に同等な蛋白質としては、具体的には、配列番号: 4 から 6 のいずれかに示されるアミノ酸配列中の 1 又は 2 個以上、好ましくは、2 個以上 30 個以下、より好ましくは 2 個以上 10 個以下のアミノ酸が欠失したもの、配列番号: 4 から 6 のいずれかに示されるアミノ酸配列に 1 又は 2 個以上、好ましくは、2 個以上 30 個以下、より好ましくは 2 個以上 10 個以下のアミノ酸が付加したもの、配列番号: 4 から 6 のいずれかに示されるアミノ酸配列中の 1 又は 2 個以上、好ましくは、2 個以上 30 個以下、より好ましくは 2 個以上 10 個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたものが挙げられる。

【0023】

あるアミノ酸配列に対する 1 又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. *Nucleic Acids Research* (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., *Science* 2

24, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U SA (1982) 79, 6409-6413)。

【0024】

例えば、GTAR14蛋白質に1又は複数個のアミノ酸残基が付加された蛋白質として、GTAR14蛋白質を含む融合蛋白質が挙げられる。融合蛋白質は、GTAR14蛋白質と他のペプチド又は蛋白質とが融合したものであり、本発明に包含される。融合蛋白質を作製する方法は、GTAR14蛋白質をコードするDNAと他のペプチド又は蛋白質をコードするDNAをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、すでに公知の手法を用いることができる。本発明の蛋白質との融合に付される他のペプチド又は蛋白質としては、特に限定されない。

【0025】

例えば、ペプチドとしては、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis (ヒスチジン) 残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素(HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、 $\alpha$ -tubulinの断片、B-tag、Protein Cの断片等、すでに公知であるペプチドが使用される。また蛋白質としては、例えばGST (グルタチオン・S・トランスフェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合蛋白質) 等が挙げられる。市販されているこれらをコードするDNAを融合させたものを用いることができる。

【0026】

本発明の蛋白質はまた、配列番号：1から3のいずれかに示される塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされており、且つGTAR14蛋白質と機能的に同等な蛋白質を含む。ストリンジントな条件としては、当業者であれば適宜選択することができるが、例えば低ストリンジントな条件が挙げられる。低ストリンジントの条件とは、例えば42℃、2×SSC、0.1%SDSが挙げられ、好ましくは50℃、2×SSC、0.1%SDSである。またより好ましくは、高ストリンジントな条件が挙げられる。高ストリン

ジェントな条件とは、例えば65℃、2×SSC及び0.1%SDSが挙げられる。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAを得ることができる。

【0027】

また、本発明にはGTAR14蛋白質と機能的に同等であり、且つ該蛋白質のアミノ酸配列（配列番号：4から6）と相同性を有する蛋白質も含まれる。相同性を有する蛋白質とは、配列番号：4から6のいずれかに示されるアミノ酸配列と、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%以上、アミノ酸配列上の相同性を有する蛋白質を意味する。蛋白質の相同性を決定するには、文献（Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730）に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

【0028】

本発明の蛋白質は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態が異り得る。しかしながら、得られた蛋白質がG蛋白質結合型受容体蛋白質活性を有している限り、本発明に含まれる。

【0029】

本発明の蛋白質を製造するには、得られたDNAを発現制御領域、例えばエンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現可能なように発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、蛋白質を発現させる。

【0030】

具体的には次のようにすればよい。哺乳類細胞を使用する場合、常用される有用なプロモーター／エンハンサー、本発明の蛋白質をコードするDNA、その3'側下流にポリA シグナルを機能的に結合させたDNA あるいはそれを含むベクターを構築する。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー（human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer）を挙げることができる。

## 【0031】

また、その他に蛋白質発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV 40) 等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター-1 $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ ) の哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

## 【0032】

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 $\alpha$  プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

## 【0033】

大腸菌を使用する場合、常用される有用なプロモーター、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列、発現させる遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1988) 334, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

## 【0034】

蛋白質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。

## 【0035】

複製開始点としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシバピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺



伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

【0036】

本発明の蛋白質を製造するための発現ベクターは、本発明に好適に使用される発現ベクターであればいかなる発現ベクターであってよい。本発明の発現ベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター、例えば pEF、pCDM8、昆虫細胞由来の発現ベクター、例えば pBacPAK8、植物由来の発現ベクター、例えば pMH1、pMH2、動物ウイルス由来の発現ベクター、例えば pHSV、pMV、pAdexLcw、レトロウイルス由来の発現ベクター。例えば pZipneo、酵母由来の発現ベクター、例えば pNV11、SP-Q01、枯草菌由来の発現ベクター、例えば pPL608、pKTH50、大腸菌由来の発現ベクター、例えば pQE、pGEAPP、pGEMEAPP、pMALp2 が挙げられる。

【0037】

本発明のベクターは、*in vivo*、*in vitro* で本発明の蛋白質を製造するのみならず、哺乳動物、例えばヒトの遺伝子治療に用いることもできる。

【0038】

上述のように構築された本発明の発現ベクターの宿主への導入方法としては、公知の方法、例えばリン酸カルシウム法 (Virology (1973) 52, 456-467) やエレクトロポレーション法 (EMBO J. (1982) 1, 841-845) 等が用いられる。

【0039】

本発明において、蛋白質の製造のために、任意の産生系を使用することができる。蛋白質製造のための産生系は、*in vitro* および *in vivo* の産生系がある。*in vitro* の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【0040】

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば sf9、sf21、Tn5 が知られている。CHO 細胞としては、特に DHFR 遺伝子を欠損した CHO 細胞である dhfr-CHO (Proc. Na

tl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220 ) や CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。

#### 【0041】

植物細胞としては、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えばアスペルギルス属 (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

#### 【0042】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。

#### 【0043】

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより蛋白質が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30~40℃で約15~200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

#### 【0044】

一方、*in vivo* の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は植物の体内で蛋白質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

#### 【0045】

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

## 【0046】

例えば、目的とするDNAをヤギ $\beta$ カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。このDNAが挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から蛋白質を得る。トランスジェニックヤギから産生される蛋白質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。(Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

## 【0047】

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的とするDNAを挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の蛋白質を得る(Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

## 【0048】

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするDNAを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコチアナ・タバカム(*Nicotiana tabacum*)に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得る(Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

## 【0049】

これにより得られた本発明の蛋白質は、細胞内外、宿主から単離し実質的に純粋で均一な蛋白質として精製することができる。蛋白質の分離、精製は、通常の蛋白質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば蛋白質を

分離、精製することができる。

【0050】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製された蛋白質も包含する。

【0051】

なお、蛋白質を精製前又は精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼが用いられる。

【0052】

本発明はまた、GTAR14蛋白質（配列番号：4から6）の部分ペプチドを含む。部分ペプチドとしては、例えば、GTAR14遺伝子がコードする部分ペプチド配列のうち、生体内に存在するリガンドとの結合部位に相当するペプチドが挙げられる。このような部分ペプチドは、生体投与することで、本来のリガンドと拮抗的に結合し、GTAR14蛋白質とリガンドとの結合を競合阻害することが可能である。また、同様にG蛋白質との結合部位に相当する部分ペプチドを用いれば、GTAR14蛋白質と細胞内G蛋白質との結合を拮抗的に競合阻害することが可能である。これら部分ペプチドは、GTAR14蛋白質を介したシグナル伝達の阻害剤として有用である。

【0053】

本発明の蛋白質の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造す

ることができる。ペプチド合成法としては、たとえば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。

【0054】

また、本発明は、上記本発明の蛋白質をコードするDNAに関する。本発明の蛋白質をコードするcDNAは、例えば、本明細書に記載のプロープを用いヒトcDNAライブラリーをスクリーニングして得ることができる。

【0055】

得られたcDNA又はcDNA断片をプロープとして、さらにcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより異なる細胞、組織、臓器又は種からcDNAを得ることができる。cDNAライブラリーは、例えばSambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載の方法により調製してもよいし、市販のDNAライブラリーを用いてもよい。

【0056】

また、得られたcDNAの塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、本発明の蛋白質のアミノ酸配列を得ることができる。また、得られたcDNAをプロープとしてジェノミックDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、ジェノミックDNAを単離することができる。

【0057】

具体的には、次のようにすればよい。まず、本発明の蛋白質を発現する細胞、組織、臓器から、mRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 529 4-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia)等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

【0058】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生

化学工業)等を用いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプローブを用いて、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製)およびポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR) を用いた5'-RACE法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) にしたがって、cDNAの合成および増幅を行うことができる。

## 【0059】

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認すればよい。

## 【0060】

また、本発明のDNAは、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, p43-p74)。また、本発明のDNAを市販のキットや公知の方法によって改変することができる。例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNAフラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン (ATG) 及び／又は終始コドン (ATT、TGA又はTAG) の挿入等が挙げられる。

## 【0061】

本発明のDNAは、具体的には配列番号：1の塩基配列において9位の塩基Aから947位の塩基CからなるDNA、配列番号：2の塩基配列において13位のAから951位の塩基TからなるDNA、および配列番号：3の塩基配列において410位の塩基Aから1339位の塩基TからなるDNAを包含する。

## 【0062】

本発明のDNAはまた、配列番号：1から3のいずれかに示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、且つ上記本発明の蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAを含む。

## 【0063】

ストリンジェントな条件としては、当業者であれば適宜選択することができるが、例えば低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントの条件とは、例えば42℃、2×SSC、0.1% SDSが挙げられ、好ましくは50℃、2×SSC、0.1% SDSである。またより好ましくは、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば65℃、2×SSC及び0.1% SDSが挙げられる。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAを得ることができる。上記のハイブリダイズするDNAは好ましくは、cDNAまたは染色体DNAである。

## 【0064】

本発明の蛋白質は、これに結合する化合物のスクリーニングに有用である。すなわち、本発明の蛋白質と、該蛋白質に結合する化合物を含むと予想される被験試料とを接触せしめ、そして本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する、ことからなる本発明の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法において使用される。

## 【0065】

スクリーニングに用いられる本発明の蛋白質は組換え型、天然型又は部分ペプチドのいずれであってもよい。また、精製した蛋白質やその部分ペプチドであっても、細胞表面に発現させた形態、膜面分としての形態であってもよい。

## 【0066】

また、本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物としては、天然由来であっても、人工的に合成された化合物であってもよい。天然由来の化合物としては、例えば、本発明の蛋白質に結合するリガンドが挙げられる。本発明において「リガンド」とは、本発明の蛋白質に結合することにより、本発明の蛋白質を発現する細胞に対して特定の生理活性作用を発現させる、天然由来の化合物を指す。該生理活性作用には、後述する、cAMPの産生、細胞内Ca濃度の変化、プロテインキナーゼCの活性化などの生化学的变化が含まれる。

## 【0067】

本発明の蛋白質と結合する蛋白質のスクリーニング方法は、例えば、ウェスト

ウエスタンブロッティング法 (Skolnik, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90) を用いて行うことができる。本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していると予想される細胞、組織、臓器より cDNA を単離し、これをファージベクター、例えば  $\lambda$ gt11、ZAPII 等へ導入して cDNA ライブラリーを作製し、これを培地を引いたプレート上で発現させ、フィルターに発現させた蛋白質を固定し、標識して精製した本発明の蛋白質と上記フィルターとを反応させ、本発明の蛋白質と結合した蛋白質を発現するプラークを標識により検出すればよい。本発明の蛋白質を標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、本発明の蛋白質又は本発明の蛋白質に融合したペプチド又はポリペプチドに特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

## 【0068】

また、本発明のスクリーニング方法の他の態様としては、細胞を用いた two-ハイブリッドシステム (Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292) を用いて行う方法が挙げられる。

## 【0069】

本発明の蛋白質とヘテロダイマーからなる転写調節因子の一方のサブユニットとの融合蛋白質をコードする DNA を含む発現ベクター及び被験試料として所望の cDNA とヘテロダイマーからなる転写調節因子のもう一方のサブユニットをコードする DNA を連結してなる DNA を含む発現ベクターを細胞に導入して発現させ、本発明の蛋白質に cDNA がコードする蛋白質が結合して該転写調節因子がヘテロダイマーを形成した場合、あらかじめ細胞内に構築したレポーター遺伝子が発現するような two-ハイブリッドシステムを用いることができる。本発明の蛋白質に結合する蛋白質が存在した場合、レポーター遺伝子の発現量を検出又は測定することにより蛋白質を選択することができる。

## 【0070】

具体的には、次のようにすればよい。すなわち、本発明の蛋白質をコードする DNA と LexA の DNA 結合ドメインをコードする遺伝子とをフレームが一致するように連結し、発現ベクターを作製する。次に、所望の cDNA と GAL4 転写活性



化ドメインをコードする遺伝子とを連結せしめることにより発現ベクターを作製する。

【0071】

LexA結合モチーフが存在するプロモーターにより転写が調節されるHIS3遺伝子を組み込んだ細胞を上記のtwo-ハイブリッドシステム発現プラスミドを用いて形質転換した後、ヒスチジン不含合成培地上でインキュベートすると蛋白質の相互作用が認められたときのみ細胞の生育が観察される。このように、形質転換体の生育程度によりレポーター遺伝子の発現量の増加を調べることができる。

【0072】

レポーター遺伝子としては、HIS3遺伝子の他、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type1) 遺伝子等を用いることができる。

【0073】

two-ハイブリッドシステムは、通常用いられている方法により構築してもよいし、市販のキットを用いてもよい。市販のtwo-ハイブリッドシステムのキットとしては、MATCHMARKER Two-Hybrid System、Mammalian MATCHMARKER Two-Hybrid Assay Kit (いずれもCLONTECH製)、HybriZAP Two-Hybrid Vector System (Stratagene製) が挙げられる。

【0074】

本発明におけるスクリーニング方法の他の態様は、アフィニティクロマトグラフィーを用いて行うことができる。すなわち、本発明の蛋白質をアフィニティークラムの担体に固定し、ここに本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していることが予想される被験試料を適用する。この場合の被験試料としては、細胞の培養上清、細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被験試料を適用した後、カラムを洗浄し、本発明の蛋白質に結合した蛋白質を得ることができる。

【0075】

また、本発明の蛋白質を適当な宿主細胞表面に安定的に発現せしめた後、リガンドを含むと考えられる試料を該細胞に接触せしめることにより、該細胞に誘起される生化学的变化を検出することによって、本発明の蛋白質に結合する化合物のスクリーニングを行うことも可能である。宿主細胞としては、種々の哺乳動物

細胞を利用することが可能であるが、好ましくは本発明の蛋白質が本来発現している細胞、例えば、免疫細胞である。指標となる生化学的変化としては、本発明の蛋白質に結合するG蛋白質の種類により異なるが、例えば、cAMPの産生、細胞内Ca濃度の変化、プロテインキナーゼCの活性化などが挙げられる。また、より一般的な指標として、マイクロフィジオメータ（例えば、モレキュラーデバイス社製「サイトセンサー<sup>R</sup>」）を利用した微小細胞外pH変化を用いることも可能である。

## 【0076】

本発明のスクリーニング方法で使用される被験試料としては、例えばペプチド、精製若しくは粗精製蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、微生物発酵生産物、細胞抽出液、動物組織抽出液、海洋生物抽出液、植物抽出液が挙げられる。

## 【0077】

上記のスクリーニング方法によって単離される化合物は、本発明の受容体蛋白質の機能異常などに起因する疾患において、本発明の蛋白質の活性を促進又は阻害するための薬剤の候補となる。本発明のスクリーニング方法を用いて得られる、本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される物質も、本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物に含まれる。

## 【0078】

また、上述した生化学的変化を指標に、あるいは本発明の受容体蛋白質とリガンドとの結合を阻害する活性を指標に、該受容体蛋白質に対するアゴニストやアンタゴニストをスクリーニングすることも可能である。本発明において「アゴニスト」とは、本発明の蛋白質に結合することにより、細胞に、リガンドと同様の生理活性作用を発現させる、非天然由来の化合物を指す。また、本発明において「アンタゴニスト」とは、本発明の蛋白質に対するリガンドやアゴニストの作用を阻害する化合物を指し、天然由来および非天然由来の化合物を含む。

## 【0079】

細胞内における生化学的変化を指標とした方法においては、例えば、上述した

本発明の蛋白質を安定的に発現させた細胞に、リガンドの共存下で、被検試料を接触させ、上述した生化学的指標を測定する。その結果、該生化学的指標における、例えば、cAMPの産生、細胞内Ca濃度の変化、プロテインキナーゼCの活性化などが阻害されれば、該被検試料に含まれる化合物は本発明の蛋白質のアンタゴニストであると判定される。

【0080】

また、例えば、上述した本発明の蛋白質を安定的に発現させた細胞に、直接、被検試料を接触させ、上述した生化学的変化を測定することによりアゴニストを単離することもできる。

【0081】

また 本発明の受容体蛋白質とリガンドとの結合を阻害する活性を指標とした、アゴニストやアンタゴニストの単離は、例えば、ファージディスプレイ法を利用して行うことが可能である。この方法においては、例えば、文献 (Nicholas C. et al. Science, vol273, p458, 1996) に従い、pSKAN Phagemid Display System (カタログ番号0B-15 18-00) を用いればよい。

【0082】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物をヒトや哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合、常用される手段に従って実施することができる。

【0083】

例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば本発明の蛋白質と結合活性を有する物質を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤とともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

## 【0084】

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

## 【0085】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM)、HCO-50と併用してもよい。

## 【0086】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

## 【0087】

本発明の蛋白質と結合活性を有する化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。

## 【0088】

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投

与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0089】

本発明の抗体は、公知の手段を用いてモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体として得ることができる。

【0090】

本発明の蛋白質に対して特異的に結合する抗体は、蛋白質を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0091】

具体的には、本発明の蛋白質に対して特異的に結合するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

【0092】

例えば、抗体取得の感作抗原として使用される本発明の蛋白質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来の蛋白質が好ましく、特にヒト由来の蛋白質が好ましい。ヒト由来の蛋白質は、本明細書に開示される遺伝子配列又はアミノ酸配列を用いて得ることができる。

【0093】

本発明において、感作抗原として使用される蛋白質は、本明細書に記載された全ての蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質を使用できる。また、蛋白質の部分ペプチドも用いることができる。蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば蛋白質のアミノ基（N）末端断片やカルボキシ（C）末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とは蛋白質の全長又は断片に特異的に反応する抗体を意味する。

【0094】

本発明の蛋白質又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入して本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞内外又は、

宿主から目的の蛋白質又はその断片を公知の方法で得、この蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、蛋白質を発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明の蛋白質を感作抗原として使用してもよい。

## 【0095】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

## 【0096】

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えばサルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

## 【0097】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与し、以降フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4~21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

## 【0098】

ここで、本発明の蛋白質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としてポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離してもよい。

## 【0099】

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。

## 【0100】

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

## 【0101】

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

## 【0102】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したヒトリンパ球をin vitroで蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、蛋白質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭63-17688）。

## 【0103】

さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となる蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いて蛋白質に対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号W092-03918、W093-2227、W09

4-02602、W094-25585、W096-33735およびW096-34096参照)。

【0104】

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子 (oncogene) により不死化させた細胞を用いてもよい。

【0105】

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる (例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照)。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

【0106】

本発明の抗体は、本発明の蛋白質に結合するかぎり、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる (例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

【0107】

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含



される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

## 【0108】

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来のCDR（相補性決定領域）とヒト抗体由来のFR（フレームワーク領域）及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

## 【0109】

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使われている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)等により行うことができる。

## 【0110】

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA、EIA（酵素免疫測定法）、RIA（放射免疫測定法）あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、ELISAを用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明の蛋白質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えばアルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。蛋白質として蛋白質の断片、例えばそのC末端からなる断片あるいはN末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia製)を使用することができる。

## 【0111】

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質との免疫複合体を検出又は測定することからなる、本発明の蛋白質の検出又は測定方法を実施することができる。

## 【0112】

本発明の蛋白質の検出又は測定方法は、蛋白質を特異的に検出又は測定することができるため、蛋白質を用いた種々の実験等に有用である。

## 【0113】

本発明は、配列番号：1から3のいずれか一つに示される塩基配列からなるDNAまたは該DNAと相補的なDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNAを包含する。すなわち、本発明の蛋白質をコードするDNA又は該DNAと相補的なDNAと選択的にハイブリダイズし得るプローブ、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム等が含まれる。

## 【0114】

本発明は、例えば、配列番号：1から3のいずれか一つに示される塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：1から3のいずれか一つに示される塩基配列中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、前記連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含む、前記のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

## 【0115】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。このような修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

## 【0116】

ここでいう「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、DNA又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補的であるもののみならず、DNA又はmRNAとオリゴヌクレオチドとが配列番号：1に示される塩基配列に選択的に安定にハイブリダイズできる限り、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。

## 【0117】

選択的に安定にハイブリダイズするとは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他の蛋白質をコードするDNAとのクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。このようなDNAとしては、少なくとも15個の連続したヌクレオチド配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有するものを示す。なお、相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなDNAは、後述の実施例に記載するように本発明の蛋白質をコードするDNAを検出若しくは単離するためのプローブとして、又は増幅するためのプライマーとして有用である。

## 【0118】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明の蛋白質の産生細胞に作用して、該蛋白質をコードするDNA又はmRNAに結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNAの分解を促進したりして、本発明の蛋白質の発現を抑制することにより、結果的に本発明の蛋白質の作用を抑制する効果を有する。

## 【0119】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤等の外用剤とすることができる。

## 【0120】

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リボソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。

## 【0121】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いること

もできる。例えば、リボソーム、ポリ-L- リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

#### 【0122】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1 ～100mg/kg好ましくは0.1 ～50mg/kg の範囲で投与することができる。

#### 【0123】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは本発明の蛋白質の発現を阻害し、したがって本発明の蛋白質の生物学的活性を抑制することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する発現阻害剤は、本発明の蛋白質の生物学的活性を抑制することが可能である点で有用である。

#### 【0124】

##### 【実施例】 【実施例1】 Blast 検索

Blast 検索により、GenBank の nr データベースから、既知の Olfactory 受容体(OR)遺伝子ファミリーと構造的に高い相同性を保有する、新規7回膜貫通型G蛋白質結合型受容体遺伝子を含むヒトゲノム配列を見出した。見出された遺伝子は、 $\alpha/\delta$  T-細胞受容体座位近傍のヒト第14染色体に由来するBAC129クローン(GenBank Accession# U85195)の配列内に認められ、既知のヒトOlfactory 受容体 1(OLF1)、OLF2、及びOLF3とアミノ酸翻訳レベルで約50%～60%の相同性を示した。

#### 【0125】

後述する遺伝子発現様態の解析結果と機能予測結果から、単離した3つの遺伝子をそれぞれ「G-protein-coupled T-cell Activating Receptor 14-1」(GTAR14-1)、「G-protein-coupled T-cell Activating Receptor 14-3」(GTAR14-3)、「G-protein-coupled T-cell Activating Receptor 14-5」(GTAR14-5)と命名した。

#### 【0126】

既知OR遺伝子群のゲノム構造は、それらをコードするゲノム配列の1つのエクソン配列内に、開始コドンから終始コドンまでのORFを含んでいる特徴を持つ。G

TAR14-1、GTAR14-3、およびGTAR14-5も同様に、1つのエクソンと考えられる配列内にORFの全長を認めることができた。

【0127】

ここで、同じBAC129クローンの配列内に、別の新規OR様遺伝子も同時に見出し、それぞれGTAR14-2、GTAR14-4と命名した。GTAR14-2を他のOR遺伝子群と比較して、アミノ酸翻訳レベルでの相同性を得るためには、途中に1塩基の欠損があり、相同的配列が2つのORFに分断された。一方、GTAR14-4を他のOR遺伝子群と比較して、アミノ酸翻訳レベルでの相同性を得ようとする、第2細胞外領域(ループ-1)にインフレームの終始コドンが出現し、相同的配列が2つのORFに分断された。従って、これらは、典型的なOR遺伝子群の偽遺伝子であると判断できたため、検索対象から除外した。

【0128】

図1に既知のヒトOLF1、OLF2、及びOLF3と、GTAR14-1、及びGTAR14-2のアミノ酸配列を比較して記載するが、GTAR14-2においては欠損した1塩基を任意の塩基で補うことにより、人為的に翻訳枠を模造したアミノ酸配列である。

【0129】

また、図2に既知のヒトOLF1、OLF2、及びOLF3と、GTAR14-3のアミノ酸配列を比較して記載する。

【0130】

また、図3に既知のヒトOLF1、OLF2、及びOLF3と、GTAR14-4、及びGTAR14-5のアミノ酸配列を比較して記載するが、GTAR14-4においては途中のインフレームの終始コドンを読み越して、人為的に翻訳枠を模造したアミノ酸配列である。

【0131】

[実施例2] ジェノミックPCRによるGTAR14-1遺伝子、GTAR14-3遺伝子、およびGTAR14-5遺伝子の単離

BAC129クローンU85195の配列内において、既知OLFレセプターにアミノ酸翻訳レベルで、広く保存されているエクソン領域を予測し、その予測したエクソン領域の配列上に以下のプライマーを合成した。

【0132】

GTAR14-1増幅用のプライマーとしては、センスプライマーとして、GTAR14-1-S1「5'- ATG GAC AGT CTA AAC CAA ACA AGA GTG -3' / 配列番号 : 7」、GTAR14-1-S2「5'- ATG GCA TTC TCA GCC ATT TAT ATG CTA -3' / 配列番号 : 8」、「GTAR14-1-S3」(5'- GGG AAC ATT CTC ATC ATC ATT GCC ACA -3' / 配列番号 : 9)を、アンチセンスプライマーとして、GTAR14-1-A1「5'- TTA TGT ATA TGA TTT C GT GAA AAA AAC -3' / 配列番号 : 10」、GTAR14-1-A2「5'- TAC CTC CTC ATT CC T CAA GGT GTA AAT -3' / 配列番号 : 11」、GTAR14-1-A3「5'- GGT GAC CAC TGT GTA GAA GAC AGA CAC -3' / 配列番号 : 12」を用いた。

## 【0133】

また、GTAR14-3増幅用のプライマーとしては、センスプライマーとして、GTAR14-3-S1「5'- ATG GAA AGA ATC AAC AGC ACA CTG TTG -3' / 配列番号 : 13」、GTAR14-3-S2「5'- TCT AAT CTA CAT CCT GAC TCA GCT GGG -3' / 配列番号 : 14」を、アンチセンスプライマーとして、GTAR14-3-A1「5'- TTC AAA CCT CAC TCG GAG TTC TTG GGC -3' / 配列番号 : 15」、GTAR14-3-A2「5'- AGC TTC ACC TCT TGG TTC CGC AGA GTG -3' / 配列番号 : 16」を用いた。

## 【0134】

また、GTAR14-5増幅用のプライマーとしては、センスプライマーとして、GTAR14-5-S1「5'- ATG GGA AAG ACC AAA AAC ACA TCG CTG -3' / 配列番号 : 17」、GTAR14-5-S2「5'- CGT GGT GAC AGA TTT CAT TCT TCT GGG -3' / 配列番号 : 18」を、アンチセンスプライマーとして、GTAR14-5-A1「5'- TCA ACC TGC TGT TAT CCT CTT CAG GGC -3' / 配列番号 : 19」、GTAR14-5-A2「5'- CCT GGT TCC TCA GTG TAT AGA TGA GGG -3' / 配列番号 : 20」を用いた。

## 【0135】

Human Genomic DNA (Clontech#6550-1) を鋳型として用い、GTAR14-1増幅のために「14-1-S1および14-1-A1」、「14-1-S1および14-1-A2」、「14-1-S2および14-1-A1」、「14-1-S2および14-1-A2」の各組合わせ、GTAR14-3増幅のために「14-3-S1および14-3-A1」、「14-3-S1および14-3-A2」、「14-3-S2および14-3-A1」、「14-3-S2および14-3-A2」の各組合わせ、GTAR14-5増幅のために「14-5-S1および14-5-A1」、「14-5-S1および14-5-A2」、「14-5-S2および14-5-A1」、「14-

5-S2および14-5-A2」の各組合わせによるジェノミックPCRを試みた。PCRにはAdvantage cDNA Polymerase Mix (Clontech #8417-1)を用い、Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400サーマルサイクラーを使用した。PCR反応は下記の実験条件にて実施したところ、それぞれのプライマーでの組合わせにおいて、予想されるサイズに単一のバンドが検出された。

【0136】

なお、PCRの条件は、94℃で4分、「94℃で20秒、72℃で2分」を5サイクル、「94℃で20秒、70℃で2分」を5サイクル、「94℃で20秒、68℃で2分」を28サイクル、72℃で4分、および4℃で終結で行った。

【0137】

得られたジェノミックPCR産物を、pGEM-T Easy vector (Promega#A1360)にサブクローニングし、塩基配列を決定した。PCR産物のpGEM-T Easy vectorへの組換えは、T4 DNA リガーゼ (Promega#A1360)によって、4℃で12時間の反応をおこなった。PCR産物とpGEM-T Easy vectorの遺伝子組換え体は、大腸菌株 DH5?? (Toyobo#DNA-903)を形質転換することによって得られた。また、遺伝子組換え体の選別には、Insert Check Ready (Toyobo#PIK-101)を用いた。さらに、塩基配列の決定には、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI/Perkin Elmer#4303141)を使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencerによって解析をおこなった。

【0138】

ここで標的遺伝子断片の最も外側に位置するプライマーどうしの組合わせによるジェノミックPCR産物、即ち、GTAR14-1遺伝子の増幅においては14-1-S1および14-1-A1のプライマーセットを用いた増幅産物、GTAR14-3遺伝子の増幅においては14-3-S1および14-3-A1のプライマーセットを用いた増幅産物、GTAR14-5伝子の増幅においては14-5-S1および14-5-A1のプライマーセットを用いた増幅産物より、それぞれ独立する10クローンの遺伝子組換え体を選別し、全インサート断片の塩基配列を決定した。

【0139】

その結果、GTAR14-1遺伝子およびGTAR14-3遺伝子の増幅においては全クローン

ともに942 bpの単一な塩基配列を示した。また、GTAR14-5伝子の増幅においては全クローンともに933 bpの単一な塩基配列を示した。これらの得られた配列が、それぞれの遺伝子の部分塩基配列であることを確認し、非特異的なジェノミックPCR増幅でないことを認めた。これにより、実施例3に記載のRT-PCRにおいても、これらプライマーセットが正しく作用できるであろうことが期待された。ジェノミックPCRにより得られたGTAR14-1、GTAR14-3、およびGTAR14-5の部分塩基配列をそれぞれ図4、5、6および配列番号：21、22、23に示す。

## 【0140】

【実施例3】 RT-PCRによるGTAR14-1、GTAR14-3遺伝子、GTAR14-5遺伝子の発現組織の検索と発現様態の解析

各ヒト臓器におけるGTAR14-1の遺伝子発現分布、及び遺伝子発現様態を解析するために、GTAR14-1遺伝子、GTAR14-3遺伝子、GTAR14-5遺伝子の増幅においては、それぞれ「14-1-S2および14-1-A2」の組合わせ、「14-3-S2および14-3-A2」の組合わせ、「14-5-S2および14-5-A2」の組合わせによる、RT-PCRを行った。

## 【0141】

鋳型として、Human Fetal Multiple Tissue cDNA Panel (Clontech#K1425-1)、Human Multiple Tissue cDNA Panel I (Clontech#K1420-1) 及び、Human Multiple Tissue cDNA Panel II (Clontech#K1421-1)を用いた。PCRにはAdvantage cDNA Polymerase Mix (Clontech#8417-1)を用い、Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400サーマルサイクラーを使用した。PCRの条件は、94℃で4分、「94℃で20秒、72℃で2分」を5サイクル、「94℃で20秒、70℃で2分」を5サイクル、「94℃で20秒、68℃で2分」を38サイクル、72℃で4分、および4℃で終結で行った。

## 【0142】

この結果、ヒト胎児臓器由来のGTAR14-1 mRNA においては、胎児胸腺でのみ強いPCR産物の増幅が認められ、成人臓器由来のmRNA においては、胸腺、脾臓といったリンパ造血系、及び精巣と膵臓において特に強く検出された(図7)。

## 【0143】

ヒト胎児臓器由来のGTAR14-3 mRNA においては、胸腺、脳、心臓、平滑筋、及



び腎臓で強いPCR 産物の増幅が認められ、また、肝臓と肺においても弱い遺伝子発現が認められた。成人臓器由来の mRNA においては、胸腺、及び精巣において特に強く検出された。また、小腸、結腸などの消化管や、胎盤、前立腺といった内分泌系でも遺伝子発現が認められ、幅広い発現組織分布を示した(図8)。

【0144】

ヒト胎児臓器由来のGTAR14-5 mRNA においては、胎児胸腺、胎児脾臓、胎児肺で強いPCR 産物の増幅が認められ、また、胎児脳、胎児腎臓においても弱い遺伝子発現が認められた。一方、成人臓器由来の mRNA においては、胸腺、脾臓、末梢白血球といったリンパ造血系、及び精巣、脾臓において強く検出された(図9)。

【0145】

得られたそれぞれのPCR 産物を、pGEM-T Easy vector (Promega #A1360) にサブクローニングし、塩基配列を決定した。PCR 産物のpGEM-T Easy vectorへの組換えは、T4 DNA Ligase (Promega#A1360) によって、4℃で12時間の反応をおこなった。PCR 産物とpGEM-T Easy vectorの遺伝子組換え体は、大腸菌株 DH5 ?? (Toyobo#DNA-903)を形質転換することによって得られた。また、遺伝子組換え体の選別には、Insert Check Ready (Toyobo#PIK-101)を用いた。さらに、塩基配列の決定には、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI/Perkin Elmer#4303141)を使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencer によって解析をおこなった。それぞれ独立する10クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を決定した結果、全クローンともに単一の塩基配列を示した。

【0146】

得られた配列が、それぞれGTAR14-1、GTAR14-3、GTAR14-5の部分塩基配列である事を確認し、非特異的なRT-PCR増幅でないことを認めた。

【0147】

[実施例4] 5' -及び3' -RACE法による完全長cDNAクローニング

(1) 5' -RACE法

GTAR14-1、GTAR14-3、およびGTAR14-5の全長 cDNA を単離するために、5' RACE-PCRを試みた。GTAR14-1遺伝子、GTAR14-3遺伝子、およびGTAR14-5遺伝子の増

幅のために、一次PCRには、それぞれ14-1-A1、14-3-A1、14-5-A1を、二次PCRにはそれぞれ14-1-A2、14-3-A2、14-5-A2をプライマーとして用いた。

## 【0148】

鋳型としてHuman Testis Marathon-Ready cDNA Library (Clontech#7414-1)を用い、PCR 実験にはAdvantage cDNA Polymerase Mixを使用した。Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400サーマルサイクラーを使用し、下記のPCR 条件で行った結果、単一のサイズを示すPCR産物が得られた。

## 【0149】

一次PCRは、94℃で4分、「94℃で20秒、72℃で2分」を5サイクル、「94℃で20秒、70℃で2分」を5サイクル、「94℃で20秒、68℃で2分」を30サイクル、72℃で4分、および4℃で終結の条件で行った。二次PCRは、94℃で4分、「94℃で20秒、72℃で2分」を5サイクル、「94℃で20秒、68℃で2分」を28サイクル、72℃で4分、および4℃で終結の条件で行った。

## 【0150】

得られた5' RACE-PCR 産物は、前記同様、pGEM-T Easy vector にサブクローニングし、独立する6クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を決定した。塩基配列の決定には前記同様、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kitを使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencer によって解析をおこなった。

## 【0151】

## (2) 3' -RACE法

GTAR14-1、GTAR14-3、およびGTAR14-5の全長 cDNA を単離するために、3' RACE-PCRを試みた。GTAR14-1遺伝子、GTAR14-3遺伝子、およびGTAR14-5遺伝子の増幅のために、一次PCRには、それぞれ14-1-S1、14-3-S1、14-5-S1を、二次PCRにはそれぞれ14-1-S2、14-3-S2、14-5-S2をプライマーとして用いた。

## 【0152】

鋳型として5' RACE-PCR同様、Human Testis Marathon-Ready cDNA Libraryを用い、PCR 実験にはAdvantage cDNA Polymerase Mixを使用した。PCR 条件は前記5' RACE-PCR同様の条件で行った結果、単一のサイズを示すPCR産物のバンドが

得られた。それぞれの遺伝子に関し、得られたPCR産物を、前記同様、pGEM-T Easy vectorにサブクローニングし、独立する6クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、前記同様、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kitを使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencerによって解析をおこなった。この結果、それぞれの遺伝子に関し、独立した全6クローンともに単一の塩基配列を示した。この3' RACE-PCRの結果、決定した塩基配列と、前述の5' RACE-PCRの結果により決定した塩基配列とを総合することによって、GTAR14-1、GTAR14-3、およびGTAR14-5の完全長cDNAの塩基配列を決定した。決定した完全長cDNAの塩基配列を、図10および11 (GTAR14-1)、図12および13 (GTAR14-3)、図14および15 (GTAR14-5)、並びに配列番号: 1 (GTAR14-1)、配列番号: 2 (GTAR14-3)、配列番号: 3 (GTAR14-5) に示した。

【0153】

【発明の効果】

本発明により新規なG蛋白質結合型受容体蛋白質およびその遺伝子が提供された。本発明の受容体蛋白質は、その発現特性などから免疫応答や造血などに関与していることが予想されるため、これら蛋白質を利用して、免疫応答や造血細胞制御のための薬剤を開発するためのスクリーニングを行うことが可能であると考えられる。また、本発明の受容体蛋白質を利用して、免疫応答や造血などに関連して本発明の受容体蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングを行うことも可能であると考えられる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

<120> G-PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

<130> C2-009

<160> 23

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 1143

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (9)..(947)

<400> 1

ctcattga atg gac agt cta aac caa aca aga gtg act gaa ttt gtc ttc 50

Met Asp Ser Leu Asn Gln Thr Arg Val Thr Glu Phe Val Phe

1

5

10

ttg gga ctc act gat aac cgg gtg ctg gaa atg ctg ttt ttc atg gca 98

Leu Gly Leu Thr Asp Asn Arg Val Leu Glu Met Leu Phe Phe Met Ala

15

20

25

30

ttc tca gcc att tat atg cta acg ctt tca ggg aac att ctc atc atc 146

Phe Ser Ala Ile Tyr Met Leu Thr Leu Ser Gly Asn Ile Leu Ile Ile

35

40

45

att gcc aca gtc ttt act cca agt ctc cat acc ccc atg tat ttc ttc 194

Ile Ala Thr Val Phe Thr Pro Ser Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Phe  
50 55 60

ctg agc aat ctg tcc ttt att gac atc tgc cac tca tct gtc act gtg 242  
Leu Ser Asn Leu Ser Phe Ile Asp Ile Cys His Ser Ser Val Thr Val  
65 70 75

cct aag atg ttg gag ggt ttg ctt tta gaa aga aag acc att tcc ttt 290  
Pro Lys Met Leu Glu Gly Leu Leu Leu Glu Arg Lys Thr Ile Ser Phe  
80 85 90

gac aac tgc atc aca cag ctc ttc ttc cta cat ctc ttt gcc tgt gcc 338  
Asp Asn Cys Ile Thr Gln Leu Phe Phe Leu His Leu Phe Ala Cys Ala  
95 100 105 110

gag atc ttt ctg ctg atc att gtg gcg tat gat cgt tac gtg gct atc 386  
Glu Ile Phe Leu Leu Ile Ile Val Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile  
115 120 125

tgc act cca ctc cac tac ccc aat gtg atg aac atg aga gtc tgt ata 434  
Cys Thr Pro Leu His Tyr Pro Asn Val Met Asn Met Arg Val Cys Ile  
130 135 140

cag ctt gtc ttt gct ctc tgg ttg ggg ggt act gtt cac tca cta ggg 482  
Gln Leu Val Phe Ala Leu Trp Leu Gly Gly Thr Val His Ser Leu Gly  
145 150 155

cag acc ttc ttg act att cgt cta cct tac tgt ggc ccc aac att att 530  
Gln Thr Phe Leu Thr Ile Arg Leu Pro Tyr Cys Gly Pro Asn Ile Ile

160

165

170

gac agc tac ttc tgt gat gtg cct ctt gtt atc aag ctg gcc tgc aca 578

Asp Ser Tyr Phe Cys Asp Val Pro Leu Val Ile Lys Leu Ala Cys Thr

175

180

185

190

gat aca tac ctc aca gga ata ctg att gtg acc aat agt gga acc atc 626

Asp Thr Tyr Leu Thr Gly Ile Leu Ile Val Thr Asn Ser Gly Thr Ile

195

200

205

tcc ctc tcc tgt ttc ttg gcc gtg gtc acc tcc tat atg gtc atc ctg 674

Ser Leu Ser Cys Phe Leu Ala Val Val Thr Ser Tyr Met Val Ile Leu

210

215

220

gtt tct ctt cga aaa cac tca gct gaa ggg cgc cag aaa gcc ctg tct 722

Val Ser Leu Arg Lys His Ser Ala Glu Gly Arg Gln Lys Ala Leu Ser

225

230

235

acc tgc tcg gcc cac ttc atg gtg gtt gcc ctc ttc ttt ggg cca tgt 770

Thr Cys Ser Ala His Phe Met Val Val Ala Leu Phe Phe Gly Pro Cys

240

245

250

atc ttc atc tat act cgg cca gac acc agc ttc tcc att gac aag gtg 818

Ile Phe Ile Tyr Thr Arg Pro Asp Thr Ser Phe Ser Ile Asp Lys Val

255

260

265

270

gtg tct gtc ttc tac aca gtg gtc acc cct ttg ctg aat ccc ttc att 866

Val Ser Val Phe Tyr Thr Val Val Thr Pro Leu Leu Asn Pro Phe Ile

275

280

285

tac acc ttg agg aat gag gag gta aaa agt gcc atg aag cag ctc agg 914

Tyr Thr Leu Arg Asn Glu Glu Val Lys Ser Ala Met Lys Gln Leu Arg

290

295

300

cag aga caa gtt ttt ttc acg aaa tca tat aca taatgggcat tgggattgca 967

Gln Arg Gln Val Phe Phe Thr Lys Ser Tyr Thr

305

310

gacataattg cagccacatc cttaatgaaa gagcaaaagt aaagagicaa aatcaacitta 1027

tataacttgg taaattaggt aaaatggcat agagcaggtc agatttctgc tcattaaaga 1087

taagaactta ttctgttcat taaagataag aacttattaa ctattattta aataaa 1143

<210> 2

<211> 1248

<212> DNA

<213> Homo sapiens

---

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(951)

<400> 2

attctctggg at atg gaa aga atc aac agc aca ctg ttg act gcg ttt atc 51

Met Glu Arg Ile Asn Ser Thr Leu Leu Thr Ala Phe Ile

1

5

10

ctg aca gga att ccg tat cca ctc agg cta agg aca ctc ttt ttt gtg 99  
Leu Thr Gly Ile Pro Tyr Pro Leu Arg Leu Arg Thr Leu Phe Phe Val

15

20

25

ttc ttt ttt cta atc tac atc ctg act cag ctg gga aac ctg ctt att 147  
Phe Phe Phe Leu Ile Tyr Ile Leu Thr Gln Leu Gly Asn Leu Leu Ile

30

35

40

45

tta atc act gtc tgg gca gac cca agg ctc cat gcc cgc ccc atg tac 195  
Leu Ile Thr Val Trp Ala Asp Pro Arg Leu His Ala Arg Pro Met Tyr

50

55

60

atc ttt ctt ggt gtt ctc tca gtc att gat atg agc atc tcc tcc atc 243  
Ile Phe Leu Gly Val Leu Ser Val Ile Asp Met Ser Ile Ser Ser Ile

65

70

75

att gtc cct cgc ctc atg atg aac ttc act tta ggt gtc aaa ccc atc 291  
Ile Val Pro Arg Leu Met Met Asn Phe Thr Leu Gly Val Lys Pro Ile

80

85

90

---

cca ttt ggt ggc tgt gtt gct caa ctc tat ttc tat cac ttc ctg ggc 339  
Pro Phe Gly Gly Cys Val Ala Gln Leu Tyr Phe Tyr His Phe Leu Gly

95

100

105

agc acc cag tgc ttc ctc tac acc cta atg gcc tat gac agg tac ctg 387  
Ser Thr Gln Cys Phe Leu Tyr Thr Leu Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Leu

110

115

120

125



gca ata tgt cag ccc ctg cgc tac cct gtg ctc atg act gct aag ctg 435  
Ala Ile Cys Gln Pro Leu Arg Tyr Pro Val Leu Met Thr Ala Lys Leu

130

135

140

agc gcc ttg ctt gtg gct gga gcc tgg atg gca gga tcc atc cat ggg 483  
Ser Ala Leu Leu Val Ala Gly Ala Trp Met Ala Gly Ser Ile His Gly

145

150

155

gct ctc cag gcc atc cta acc ttc cgc ctg ccc tac tgt ggg ccc aat 531  
Ala Leu Gln Ala Ile Leu Thr Phe Arg Leu Pro Tyr Cys Gly Pro Asn

160

165

170

cag gtg gat tac ttc ttc tgt gac atc cct gca gtg ttg aga ctg gcc 579  
Gln Val Asp Tyr Phe Phe Cys Asp Ile Pro Ala Val Leu Arg Leu Ala

175

180

185

tgt gct gac aca aca gtc aac gag ctg gtg acg ttt gta gac att ggg 627  
Cys Ala Asp Thr Thr Val Asn Glu Leu Val Thr Phe Val Asp Ile Gly

190

195

200

205

gtg gtg gtt gcc agt tgc ttc tcc ctg atc ctc ctc tcc tac ata cag 675  
Val Val Val Ala Ser Cys Phe Ser Leu Ile Leu Leu Ser Tyr Ile Gln

210

215

220

atc att cag gcc atc ctg aga atc cac aca gct gat ggg cgg cgc cgg 723  
Ile Ile Gln Ala Ile Leu Arg Ile His Thr Ala Asp Gly Arg Arg Arg

225

230

235

gct ttt tca act tgt gga gcc cat gta acc gtg gtc acc gtg tac tat 771

Ala Phe Ser Thr Cys Gly Ala His Val Thr Val Val Thr Val Tyr Tyr

240

245

250

gtg ccc tgt gcc ttc atc tac ctg agg cct gaa acc aac agc ccc ctg 819

Val Pro Cys Ala Phe Ile Tyr Leu Arg Pro Glu Thr Asn Ser Pro Leu

255

260

265

gat ggg gca gct gcc cta gtc ccc acg gcc atc act cct ttc ctc aac 867

Asp Gly Ala Ala Ala Leu Val Pro Thr Ala Ile Thr Pro Phe Leu Asn

270

275

280

285

ccc ctt atc tac act ctg cgg aac caa gag gtg aag ctg gcc ctg aaa 915

Pro Leu Ile Tyr Thr Leu Arg Asn Gln Glu Val Lys Leu Ala Leu Lys

290

295

300

aga atg ctc aga agc cca aga act ccg agt gag gtt tgaaagtgtc 961

Arg Met Leu Arg Ser Pro Arg Thr Pro Ser Glu Val

305

310

tttctccac tagggaagct gccacaatta gaatttatta taatgttttag gcttcggtaa 1021

---

cttttttctt ttcttcttgt ttttctctt ttatatagcc atactgtatg atcaaacaca 1081

gtttaaggta aaataactaac ttcttaacag ttccttagta tcctctcaag ataactctca 1141

gccactgcaa gagtagagaa tgagaccaa tttcacaaa ctaaaccaca ttaaacaatc 1201

cagaagaaag aatgcaatag tgtattttcc aatgtctcag taataaa 1248

<210> 3

<211> 1431

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (410)..(1339)

<400> 3

ggcaacctaa aagcaagcat ggacagttcc ttggtgaata accaaaaaca agatggagtc 60

tcgctctgtt gccaggtg gagttagtg gcgccatctc ggctcgctgc ggtctccgcc 120

tcccgggttc aggcgattct ccggcctcag cctcccgggt gcgtgggatt gcaggaacta 180

gaactaaagc gaggttaatt tccacagtga gaacatgctc cagacatccg agcaccagtg 240

tggctctgga aactccacag ataccacagg actagaaaat aactggacaa tgggatgttc 300

tatcttgccc gaactgaggg atataaaaag ctccaaagac aaagaaagta ccatccaccc 360

atcccaaaag aaattatcct tccttctgaa aataagactg caaaaagac atg gga aag 418

Met Gly Lys

1

acc aaa aac aca tcg ctg gat gcc gtg gtg aca gat ttc att ctt ctg 466

Thr Lys Asn Thr Ser Leu Asp Ala Val Val Thr Asp Phe Ile Leu Leu

5

10

15

ggt ttg tct cac ccc cca aat cta aga agc ctc ctc ttc ctg gtc ttc 514

Gly Leu Ser His Pro Pro Asn Leu Arg Ser Leu Leu Phe Leu Val Phe

20 25 30 35

ttc atc att tac atc ctc act cag ctg ggg aac ctg ctc att ctg ctc 562

Phe Ile Ile Tyr Ile Leu Thr Gln Leu Gly Asn Leu Leu Ile Leu Leu

40 45 50

acc atg tgg gct gac ccg aag ctc tgt gct cgc ccc atg tac att ctt 610

Thr Met Trp Ala Asp Pro Lys Leu Cys Ala Arg Pro Met Tyr Ile Leu

55 60 65

ctg gga gtg ctc tca ttc ctg gac atg tgg ctc tcc tca gtc acc gtt 658

Leu Gly Val Leu Ser Phe Leu Asp Met Trp Leu Ser Ser Val Thr Val

70 75 80

cct cgg ctt att ttg gat ttt act cct tcc atc aag gct atc ccg ttt 706

Pro Arg Leu Ile Leu Asp Phe Thr Pro Ser Ile Lys Ala Ile Pro Phe

85 90 95

ggt ggc tgt gtg gct caa ctg tat ttc ttt cac ttc ctg ggc agc acc 754

Gly Gly Cys Val Ala Gln Leu Tyr Phe Phe His Phe Leu Gly Ser Thr

100 105 110 115

cag tgc ttc ctc tac acc ttg atg gcc tat gac agg tac cta gca ata 802

Gln Cys Phe Leu Tyr Thr Leu Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Leu Ala Ile

120 125 130

tgt cag ccc ctg cac tac cca gtg ctc atg aat ggg agg tta tgc aca 850  
Cys Gln Pro Leu His Tyr Pro Val Leu Met Asn Gly Arg Leu Cys Thr

135

140

145

gtc ctt gtg gct gga gct tgg gtc gcc ggc tcc atg cat ggg tct atc 898  
Val Leu Val Ala Gly Ala Trp Val Ala Gly Ser Met His Gly Ser Ile

150

155

160

cag gcc acc ttg acc ttc cgc ctg ccc tac tgt ggg ccc aat cag gtg 946  
Gln Ala Thr Leu Thr Phe Arg Leu Pro Tyr Cys Gly Pro Asn Gln Val

165

170

175

gat tac ttt atc tgt gac atc cgc gca gta ttg aga ctg gcc tgt gct 994  
Asp Tyr Phe Ile Cys Asp Ile Arg Ala Val Leu Arg Leu Ala Cys Ala

180

185

190

195

gac aca act gtc aat gag ctt gtg acc ttt gtg gac gtc agg gta gtg 1042  
Asp Thr Thr Val Asn Glu Leu Val Thr Phe Val Asp Val Arg Val Val

200

205

210

gcc gcc agt tgc ttc atg tta att ctg ctc tcc tat gcc aac ata gtc 1090  
Ala Ala Ser Cys Phe Met Leu Ile Leu Leu Ser Tyr Ala Asn Ile Val

215

220

225

cat gcc atc ctg aag ata cgc acc gct gat ggg agg cgc cgg gcc ttc 1138  
His Ala Ile Leu Lys Ile Arg Thr Ala Asp Gly Arg Arg Arg Ala Phe

230

235

240

tcc acc tgt ggc tcc cac cta atc gtg gtc aca gtc tac tat gtc ccc 1186

Ser Thr Cys Gly Ser His Leu Ile Val Val Thr Val Tyr Tyr Val Pro

245

250

255

tgt att ttc atc tac ctt agg gct ggc tcc aaa gac ccc ctg gat ggg 1234

Cys Ile Phe Ile Tyr Leu Arg Ala Gly Ser Lys Asp Pro Leu Asp Gly

260

265

270

275

gca gcg gct gtg ttt tac act gtt gtc act cca tta ctg aac ccc ctc 1282

Ala Ala Ala Val Phe Tyr Thr Val Val Thr Pro Leu Leu Asn Pro Leu

280

285

290

atc tat aca ctg agg aac cag gaa gtg aag tct gcc ctg aag agg ata 1330

Ile Tyr Thr Leu Arg Asn Gln Glu Val Lys Ser Ala Leu Lys Arg Ile

295

300

305

aca gca ggt tgaaggactg aatgaaaata agtaactaca tctgcatcat 1379

Thr Ala Gly

310

tatcactgcc actctcttca gctactgctg catgtgacaa atgccaata aa 1431

<210> 4

<211> 313

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Asp Ser Leu Asn Gln Thr Arg Val Thr Glu Phe Val Phe Leu Gly

1

5

10

15

Leu Thr Asp Asn Arg Val Leu Glu Met Leu Phe Phe Met Ala Phe Ser  
20 25 30

Ala Ile Tyr Met Leu Thr Leu Ser Gly Asn Ile Leu Ile Ile Ile Ala  
35 40 45

Thr Val Phe Thr Pro Ser Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Phe Leu Ser  
50 55 60

Asn Leu Ser Phe Ile Asp Ile Cys His Ser Ser Val Thr Val Pro Lys  
65 70 75 80

Met Leu Glu Gly Leu Leu Leu Glu Arg Lys Thr Ile Ser Phe Asp Asn  
85 90 95

Cys Ile Thr Gln Leu Phe Phe Leu His Leu Phe Ala Cys Ala Glu Ile  
100 105 110

Phe Leu Leu Ile Ile Val Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Thr  
115 120 125

Pro Leu His Tyr Pro Asn Val Met Asn Met Arg Val Cys Ile Gln Leu  
130 135 140

Val Phe Ala Leu Trp Leu Gly Gly Thr Val His Ser Leu Gly Gln Thr  
145 150 155 160

Phe Leu Thr Ile Arg Leu Pro Tyr Cys Gly Pro Asn Ile Ile Asp Ser

165	170	175
Tyr Phe Cys Asp Val Pro Leu Val Ile Lys Leu Ala Cys Thr Asp Thr		
180	185	190
Tyr Leu Thr Gly Ile Leu Ile Val Thr Asn Ser Gly Thr Ile Ser Leu		
195	200	205
Ser Cys Phe Leu Ala Val Val Thr Ser Tyr Met Val Ile Leu Val Ser		
210	215	220
Leu Arg Lys His Ser Ala Glu Gly Arg Gln Lys Ala Leu Ser Thr Cys		
225	230	235 240
Ser Ala His Phe Met Val Val Ala Leu Phe Phe Gly Pro Cys Ile Phe		
245	250	255
Ile Tyr Thr Arg Pro Asp Thr Ser Phe Ser Ile Asp Lys Val Val Ser		
260	265	270
Val Phe Tyr Thr Val Val Thr Pro Leu Leu Asn Pro Phe Ile Tyr Thr		
275	280	285
Leu Arg Asn Glu Glu Val Lys Ser Ala Met Lys Gln Leu Arg Gln Arg		
290	295	300
Gln Val Phe Phe Thr Lys Ser Tyr Thr		
305	310	



<210> 5

<211> 313

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Glu Arg Ile Asn Ser Thr Leu Leu Thr Ala Phe Ile Leu Thr Gly

1 5 10 15

Ile Pro Tyr Pro Leu Arg Leu Arg Thr Leu Phe Phe Val Phe Phe Phe

20 25 30

Leu Ile Tyr Ile Leu Thr Gln Leu Gly Asn Leu Leu Ile Leu Ile Thr

35 40 45

Val Trp Ala Asp Pro Arg Leu His Ala Arg Pro Met Tyr Ile Phe Leu

50 55 60

Gly Val Leu Ser Val Ile Asp Met Ser Ile Ser Ser Ile Ile Val Pro

65 70 75 80

Arg Leu Met Met Asn Phe Thr Leu Gly Val Lys Pro Ile Pro Phe Gly

85 90 95

Gly Cys Val Ala Gln Leu Tyr Phe Tyr His Phe Leu Gly Ser Thr Gln

100 105 110

Cys Phe Leu Tyr Thr Leu Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Cys

115	120	125
Gln Pro Leu Arg Tyr Pro Val Leu Met Thr Ala Lys Leu Ser Ala Leu		
130	135	140
Leu Val Ala Gly Ala Trp Met Ala Gly Ser Ile His Gly Ala Leu Gln		
145	150	155
Ala Ile Leu Thr Phe Arg Leu Pro Tyr Cys Gly Pro Asn Gln Val Asp		
165	170	175
Tyr Phe Phe Cys Asp Ile Pro Ala Val Leu Arg Leu Ala Cys Ala Asp		
180	185	190
Thr Thr Val Asn Glu Leu Val Thr Phe Val Asp Ile Gly Val Val Val		
195	200	205
Ala Ser Cys Phe Ser Leu Ile Leu Leu Ser Tyr Ile Gln Ile Ile Gln		
210	215	220
Ala Ile Leu Arg Ile His Thr Ala Asp Gly Arg Arg Arg Ala Phe Ser		
225	230	235
Thr Cys Gly Ala His Val Thr Val Val Thr Val Tyr Tyr Val Pro Cys		
245	250	255
Ala Phe Ile Tyr Leu Arg Pro Glu Thr Asn Ser Pro Leu Asp Gly Ala		
260	265	270

Ala Ala Leu Val Pro Thr Ala Ile Thr Pro Phe Leu Asn Pro Leu Ile

275

280

285

Tyr Thr Leu Arg Asn Gln Glu Val Lys Leu Ala Leu Lys Arg Met Leu

290

295

300

Arg Ser Pro Arg Thr Pro Ser Glu Val

305

310

<210> 6

<211> 310

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gly Lys Thr Lys Asn Thr Ser Leu Asp Ala Val Val Thr Asp Phe

1

5

10

15

Ile Leu Leu Gly Leu Ser His Pro Pro Asn Leu Arg Ser Leu Leu Phe

20

25

30

---

Leu Val Phe Phe Ile Ile Tyr Ile Leu Thr Gln Leu Gly Asn Leu Leu

35

40

45

Ile Leu Leu Thr Met Trp Ala Asp Pro Lys Leu Cys Ala Arg Pro Met

50

55

60

Tyr Ile Leu Leu Gly Val Leu Ser Phe Leu Asp Met Trp Leu Ser Ser

65

70

75

80

Val Thr Val Pro Arg Leu Ile Leu Asp Phe Thr Pro Ser Ile Lys Ala  
85 90 95

Ile Pro Phe Gly Gly Cys Val Ala Gln Leu Tyr Phe Phe His Phe Leu  
100 105 110

Gly Ser Thr Gln Cys Phe Leu Tyr Thr Leu Met Ala Tyr Asp Arg Tyr  
115 120 125

Leu Ala Ile Cys Gln Pro Leu His Tyr Pro Val Leu Met Asn Gly Arg  
130 135 140

Leu Cys Thr Val Leu Val Ala Gly Ala Trp Val Ala Gly Ser Met His  
145 150 155 160

Gly Ser Ile Gln Ala Thr Leu Thr Phe Arg Leu Pro Tyr Cys Gly Pro  
165 170 175

Asn Gln Val Asp Tyr Phe Ile Cys Asp Ile Arg Ala Val Leu Arg Leu  
180 185 190

Ala Cys Ala Asp Thr Thr Val Asn Glu Leu Val Thr Phe Val Asp Val  
195 200 205

Arg Val Val Ala Ala Ser Cys Phe Met Leu Ile Leu Leu Ser Tyr Ala  
210 215 220

Asn Ile Val His Ala Ile Leu Lys Ile Arg Thr Ala Asp Gly Arg Arg

225                      230                      235                      240

Arg Ala Phe Ser Thr Cys Gly Ser His Leu Ile Val Val Thr Val Tyr

245                      250                      255

Tyr Val Pro Cys Ile Phe Ile Tyr Leu Arg Ala Gly Ser Lys Asp Pro

260                      265                      270

Leu Asp Gly Ala Ala Ala Val Phe Tyr Thr Val Val Thr Pro Leu Leu

275                      280                      285

Asn Pro Leu Ile Tyr Thr Leu Arg Asn Gln Glu Val Lys Ser Ala Leu

290                      295                      300

Lys Arg Ile Thr Ala Gly

305                      310

<210>7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400>7

ATGGACAGTC TAAACCAAAC AAGAGTG 27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 8

ATGGCATTCT CAGCCATTTA TATGCTA 27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 9

GGGAACATTC TCATCATCAT TGCCACA 27

---

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 10

TTATGTATAT GATTTCGTGA AAAAAAC 27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 11

TACCTCCTCA TTCCTCAAGG TGTAAT 27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

---

<400> 12

GGTGACCACT GTGTAGAAGA CAGACAC 27

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 13

ATGGAAAGAA TCAACAGCAC ACTGTTG 27

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 14

TCTAATCTAC ATCCTGACTC AGCTGGG 27

<210>15

<211> 27

<212> DNA

---

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 15

TTCAAACCTC ACTCGGAGTT CTTGGGC 27



<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 16

AGCTTCACCT CTTGGTTCCG CAGAGTG 27

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 17

ATGGGAAAGA CCAAAAACAC ATCGCTG 27

---

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 18

CGTGGTGACA GATTTTCATTC TTCTGGG 27

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 19

TCAACCTGCT GTTATCCTCT TCAGGGC 27

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

---

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 20

CCTGGTTCCT CAGTGTATAG ATGAGGG 27

<210> 21

<

<211> 942

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

atggacagtc taaaccaaac aagagtgact gaatttgtct tcttgggact cactgataac 60

cgggtgctgg aaatgctgtt ttcatggca ttctcagcca tttatatgct aacgctttca 120

gggaacattc tcatcatcat tgccacagtc ttactccaa gtctccatac ccccatgtat 180

ttcttcciga gcaalciglc ctttatigac atctgccact catctgtcac tgtgcctaag 240

atgttggagg gtttgctttt agaaagaaag accatttcct ttgacaactg catcacacag 300

ctcttcttcc tacatctctt tgccctgtgcc gagatcttcc tgcctgatcat tgtggcgtat 360

gatcggttacg tggctatctg cactccactc cactacccca atgtgatgaa catgagagtc 420

tgtatacagc ttgtctttgc tctctgggtg ggggggtactg ttacttcact agggcagacc 480

ttcttgacta ttctgtctacc ttactgtggc cccaacatta ttgacagcta cttctgtgat 540

---

gtgcctcttg ttatcaagct ggccctgcaca gatacatacc tcacaggaat actgatgttg 600

accaatagtg gaaccatctc cctctcctgt ttcttggccg tggtcacctc ctatatggtc 660

atcctggttt ctcttcgaaa acactcagct gaaggcgcc agaaagccct gtctacctgc 720

tcggcccact tcatgggtgtg tgccctcttc ttggggccat gtatcttcat ctatactcgg 780

ccagacacca gcttctccat tgacaagggtg gtgtctgtct tctacacagt ggtcacccct 840

ttgctgaatc ccttcattta caccttgagg aatgaggagg taaaaagtgc catgaagcag 900

ctcaggcaga gacaagtttt tttcacgaaa tcatatacat aa 942

<210> 22

<211> 942

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

atggaaagaa tcaacagcac actgttgact gcgtttatcc tgacaggaat tccgtatcca 60

ctcaggctaa ggacactctt tttgtgttc tttttctaa tctacatcct gactcagctg 120

ggaaacctgc ttattttaat cactgtctgg gcagacccaa ggctccatgc ccgccccatg 180

tacatctttc ttggtgttct ctcagtcatt gatatgagca tctcctccat cattgtccct 240

---

cgccatcatga tgaacttcac tttaggtgtc aaacccatcc catttggtgg ctgtgttgct 300

caactctatt tctatcactt cctgggcagc acccagtgtt tctctacac cctaatggcc 360

tatgacaggt acctggcaat atgtcagccc ctgcgtacc ctgtgctcat gactgctaag 420

ctgagcgcct tgcttgtggc tggagcctgg atggcaggat ccatccatgg ggctctccag 480

gccatcctaa ccttccgcct gccctactgt gggcccaatc aggtggatta cttcttctgt 540  
gacatccctg cagtgttgag actggcctgt gctgacacaa cagtcaacga gctggtgacg 600  
ttttagaca ttggggtggt ggttgccagt tgcttctccc tgatcctcct ctctacata 660  
cagatcattc aggccatcct gagaatccac acagctgatg ggcggcgccg ggctttttca 720  
acttgtggag cccatgtaac cgtggtcacc gtgtactatg tgccctgtgc cttcatctac 780  
ctgaggcctg aaaccaacag cccctggat ggggcagctg ccctagtccc cacggccatc 840  
actcctttcc tcaaccccct tatctacact ctgcggaacc aagaggtgaa gctggccctg 900  
aaaagaatgc tcagaagccc aagaactccg agtgaggttt ga 942

<210> 23

<211> 933

<212> DNA

<213> Homo sapiens

---

<400> 23

atgggaaaga ccaaaaacac atcgctggat gccgtggtga cagatttcat tcttctgggt 60  
ttgtctcacc ccccaaattct aagaagcctc ctcttctctg tcttcttcat catttacatc 120  
ctcactcagc tggggaacct gctcattctg ctccatgt gggctgacct gaagctctgt 180

gctcgcccca tgtacattct tctgggagtg ctctcattcc tggacatgtg gctctcctca 240  
 gtcaccgttc ctggccttat ttgggatttt actccttcca tcaaggctat cccgttttgt 300  
 ggctgtgtgg ctcaactgta tttctttcac ttctgggca gcacccagtg cticctctac 360  
 accttgatgg cctatgacag gtacctagca atatgtcagc ccctgcacta cccagtgtct 420  
 atgaatggga ggttatgcac agtccttgtg gctggagctt gggtcgccgg ctccatgcat 480  
 gggtctatcc aggccacctt gacctccgc ctgccctact gtgggcccaa tcaggtggat 540  
 tactttatct gtgacatccg cgcagtattg agactggcct gtgctgacac aactgtcaat 600  
 gagcttgtga cttttgtgga cgtcagggtg gtggccgcca gttgcttcat gttaattctg 660  
 ctctcctatg ccaacatagt ccatgccatc ctgaagatac gcaccgctga tgggaggcgc 720  
 cgggccttct ccacctgtgg ctcccaccta atcgttgtca cagtctacta tgtcccctgt 780  
 attttcatct accttagggc tggctccaaa gaccccctgg atggggcagc ggctgtgttt 840

---

tacactgttg tcactccatt actgaacccc ctcatctata cactgaggaa ccaggaagtg 900

aagtctgccc tgaagaggat aacagcaggt tga 933

【図面の簡単な説明】 【図1】 既知ヒトOlfactory 受容体とGTAR14-1、及びGTAR14-2のアミノ酸配列比較を記載した。5種類の配列のうち4種類以上が一致する配列に影塗りを施した。また、5種類全てに保存された配列の下に点を施した。図中の記号は下記の通りである。

OLF1 ; ヒト Olfactory 受容体 1 (GenBank Accession# U56420)、OLF2 ; ヒト Olfactory 受容体 2 (GenBank Accession# L35475)、OLF3 ; ヒト Olfactory 受容体 3 (GenBank Accession# L56421)、14-1 ; GTAR14-1、14-2 ; GTAR14-2 (偽遺伝子)。

【図2】 既知ヒトOlfactory 受容体とGTAR14-3のアミノ酸配列比較を記載した(次項)。4種類の配列のうち3種類以上が一致する配列に影塗りを施した。また、4種類全てに保存された配列の下に点を施した。図中の記号は下記の通りである。

OLF1 ; ヒト Olfactory 受容体 1 (GenBank Accession# U56420)、OLF2 ; ヒト Olfactory 受容体 2 (GenBank Accession# L35475)、OLF3 ; ヒト Olfactory 受容体 3 (GenBank Accession# L56421)、14-3 ; GTAR14-3。

【図3】 既知ヒトOlfactory 受容体とGTAR14-4、及びGTAR14-5のアミノ酸配列比較を記載した。5種類の配列のうち3種類以上が一致する配列に影塗りを施した。また、5種類全てに保存された配列の下に点を施した。図中の記号は下記の通りである。OLF1 ; ヒト Olfactory 受容体 1 (GenBank Accession# U56420)、OLF2 ; ヒト Olfactory 受容体 2 (GenBank Accession# L35475)、OLF3 ; ヒト Olfactory 受容体 3 (GenBank Accession# L56421)、14-4 ; GTAR14-4 (偽遺伝子)、14-5 ; GTAR14-5。

【図4】 ジェノミックPCRにより得られた、GTAR14-1の塩基配列を示す。使用したプライマーの位置に下線を施した。14-1-S1プライマーを右向きの矢線で示し、14-1-A1プライマーを左向きの矢線で示した。

【図5】 ジェノミックPCRにより得られた、GTAR14-3の塩基配列を示す。使用したプライマーの位置に下線を施した。14-3-S1プライマーを右向きの矢線で示し、14-3-A1プライマーを左向きの矢線で示した。

【図6】 ジェノミックPCRにより得られた、GTAR14-5の塩基配列を示す。使用したプライマーの位置に下線を施した。14-5-S1プライマーを右向きの矢線で示し、14-5-A1プライマーを左向きの矢線で示した。

【図7】 RT-PCRによる各ヒト臓器におけるGTAR14-1の遺伝子発現分布を解析した結果を示す。

A ; Human Fetal MTC Panel ( Clontech#K1425-1)、B ; Human MTC Panel I ( Clontech#K1420-1)、C ; Human MTC Panel II ( Clontech#K1421-1)。

1;胎児脳、2;胎児心臓、3;胎児腎臓、4;胎児肝臓、5;胎児肺、6;胎児筋肉、7;胎児脾臓、8;胎児胸腺、9;心臓、10;脳、11;胎盤、12;肺、13;肝臓、14;骨格筋、15;腎臓、16;脾臓、17;脾臓、18;胸腺、19;前立腺、20;精巣、21;卵巣、22;小腸、23;結腸、24;末梢血白血球。

各写真ともレーン左端が同プライマーセットによる、ヒトゲノムDNAを鋳型とした陽性対照を示す。また、レーン右端が標準cDNAを鋳型として用い、G3PDHに対するプライマーセットによる増幅を確認した対照反応の産物を示す。

【図 8】 RT-PCRによる各ヒト臓器におけるGTAR14-3の遺伝子発現分布を解析した結果を示す。

A ; Human Fetal MTC Panel ( Clontech#K1425-1)、B ; Human MTC Panel I ( Clontech#K1420-1)、C ; Human MTC Panel II ( Clontech#K1421-1)。

1;胎児脳、2;胎児心臓、3;胎児腎臓、4;胎児肝臓、5;胎児肺、6;胎児筋肉、7;胎児脾臓、8;胎児胸腺、9;心臓、10;脳、11;胎盤、12;肺、13;肝臓、14;骨格筋、15;腎臓、16;脾臓、17;脾臓、18;胸腺、19;前立腺、20;精巣、21;卵巣、22;小腸、23;結腸、24;末梢血白血球。

各写真ともレーン左端が同プライマーセットによる、ヒトゲノムDNAを鋳型とした陽性対照を示す。また、レーン右端が標準cDNAを鋳型として用い、G3PDHに対するプライマーセットによる増幅を確認した対照反応の産物を示す。

【図 9】 RT-PCRによる各ヒト臓器におけるGTAR14-5の遺伝子発現分布を解析した結果を示す。

A ; Human Fetal MTC Panel ( Clontech#K1425-1)、B ; Human MTC Panel I ( Clontech#K1420-1)、C ; Human MTC Panel II ( Clontech#K1421-1)。

1;胎児脳、2;胎児心臓、3;胎児腎臓、4;胎児肝臓、5;胎児肺、6;胎児筋肉、7;胎児脾臓、8;胎児胸腺、9;心臓、10;脳、11;胎盤、12;肺、13;肝臓、14;骨格筋、15;腎臓、16;脾臓、17;脾臓、18;胸腺、19;前立腺、20;精巣、21;卵巣、22;小腸、23;結腸、24;末梢血白血球。

各写真ともレーン左端が同プライマーセットによる、ヒトゲノムDNAを鋳型と



した陽性対照を示す。また、レーン右端が標準cDNAを鋳型として用い、G3PDHに対するプライマーセットによる増幅を確認した対照反応の産物を示す。【図10】 5'-RACE、及び3'-RACEによって得られた産物を複合した、GTAR14-1完全長cDNAの塩基配列を示した。また、GTAR14-1がコードするアミノ酸配列も併記した。さらに、膜貫通領域と予測されるアミノ酸配列に下線を施した(TM-I, -II, -III, -IV, -V)。

【図11】 5'-RACE、及び3'-RACEによって得られた産物を複合した、GTAR14-1完全長cDNAの塩基配列の図10の続きを示した。また、GTAR14-1がコードするアミノ酸配列も併記した。さらに、膜貫通領域と予測されるアミノ酸配列に下線を施した(TM-VI, -VII)。

【図12】 5'-RACE、及び3'-RACEによって得られた産物をを複合した、GTAR14-3完全長cDNAの塩基配列を示した。また、GTAR14-3がコードするアミノ酸配列も併記した。さらに、膜貫通領域と予測されるアミノ酸配列に下線を施した(TM-I, -II, -III, -IV, -V)。

【図13】 5'-RACE、及び3'-RACEによって得られた産物をを複合した、GTAR14-3完全長cDNAの塩基配列の図12の続きを示した。また、GTAR14-3がコードするアミノ酸配列も併記した。さらに、膜貫通領域と予測されるアミノ酸配列に下線を施した(TM-VI, -VII)。

【図14】 5'-RACE、及び3'-RACEによって得られた産物を複合した、GTAR14-5完全長cDNAの塩基配列を示した。また、GTAR14-5がコードするアミノ酸配列も併記した。さらに、膜貫通領域と予測されるアミノ酸配列に下線を施した(TM-I, -II, -III, -IV)。

【図15】 5'-RACE、及び3'-RACEによって得られた産物を複合した、GTAR14-5完全長cDNAの塩基配列の図14の続きを示した。また、GTAR14-5がコードするアミノ酸配列も併記した。さらに、膜貫通領域と予測されるアミノ酸配列に下線を施した(TM-V, -VI, -VII)。

【書類名】 図面

【図 1】

OLF1	MEFTD-RNYT	-LVTEFILLG	FPTRPELQIV	LFLMPLTLVA	ILLIGNIGLM	LLIRIDPHLO
OLF2	M---D---NQS	S-TPGFLLLG	FSEHPGLGRT	LFVDVITSYL	LTIVGNELII	LLSALDTKLH
OLF3	MG-TD---NQT	-WVSEFILLG	LSSDWDTRVS	LFVLFLVMYV	VTVLGNCLIV	LLIRLDSRLH
14-1	M---DSLWQT	-RVTEFVFLG	LTDNRVLEML	FMAFSAIYM	LTLSGNELII	IATVETPSLH
14-2	NEEAILLNQT	SLVTFYFRLRG	LSVNHKARIA	MFSMFLIPYV	LTIGNVLIV	ITIIYDHRLLH
	*	*	*	*	**	*
OLF1	TPMYFFLSNL	SFVDLCYFSD	IVPKMLVNFL	SENKSISYTG	CALQFYFFCT	FADTESFILA
OLF2	SPMYFFLSNL	SPLDLCFTTS	CVPQMLANLW	GPKKTISFLD	CSVQIFIFLS	LGTTECILMK
OLF3	TPMYFFLTNL	SLVDVSYATS	VVPQLLAHFL	AHKAIPIQS	CAAQLFSLA	LGGIEFVLLA
14-1	TPMYFFLSNL	SFIDICHSSV	TVPKMLEGLL	LERKTISFDN	CITQLFFLHL	FACAEIFLLI
14-2	TPMYFFLSNL	SFIDVCHSTV	TVPKMLRDVW	SEKLISEDA	CVTOMFFLHL	FACTEIFLLT
	*****	***	***	***	*	*
OLF1	AMAYDRIYAI	CNPLLYTVVM	SRGICMRLIV	LSYLGGNMSS	LVHTSPAFIL	KYCDKNVINH
OLF2	VMAFDRIYAV	COPLHYATII	HPRLCWQLAS	VAWVIGLVGS	VVQIPSTLHL	PCPDRQVDD
OLF3	VMAFDRIYAV	CDALRYSAIM	HGGLCARLAI	TSWVSGFISS	PVQTAITFQL	PMCRNKFDH
14-1	IVAYDRIYAI	CTPLHYPNVM	NMRVCIQLVF	ALWLGGTVHS	LGQFTLTIRL	PYCGPNIIDS
14-2	VMAFDRIYAI	CKPLOYMIVM	NWKVCVLLAV	ALWTGGTIHS	IALTSLTIKL	PYCGPDEIDN
	** *****	***	**	*	*	*
OLF1	FFCDLPPLLK	LSCTDTTINE	WLLSTYGSSV	EIICFIIIII	SYFFILLSVL	KIRSFSGRKK
OLF2	FVCEVPALIR	LSCEDTSYNE	IQVAVASVFI	LVVPLSLILV	SYGAIWAVL	RINSATAWRK
OLF3	ISCELLAVVR	LACVDTSSNE	VTIMVSSIVL	LMTPLCLVLL	SYIQIISTIL	KIQSREGRKK
14-1	YFCDVPLVIK	LACTDTYLTG	ILIVTNSGTI	SLSCFLAVVT	SYMVIL-VSL	RKHSABGRQK
14-2	FFCDVPQVIK	LACIDTPTSL	ILIVSNSGLI	SVVCFVVLVW	SYAVIL-VSL	RQQISKGKWK
	*	*****			** *	*
OLF1	TFSTCASHLT	SVTIYOGTIL	FIYSRPSYLY	SPNTDKIISV	PYTIPTPVLN	PLIYSLRNKD
OLF2	AFGTCCSHLT	VVTLFYSSVI	AVYLOPKNPY	AQGRGKFFGL	FYAVGTPLSN	PLIVYTLRNKE
OLF3	AFHTCASHLT	VVALCYGVAI	FTYIQPHSSP	SVLOEKLFSV	FYAILTPMLN	PMIYSLRNKE
14-1	ALSTCSAHFM	VVALEEGPCI	EIYTRPDTSE	SI--DKVVS	FYTWVTEPLN	PFIYTLRNEE
14-2	ALSTCAAHLT	VVTLFLGHCI	FIYSRPSTSL	PE--DKAVSV	FFTAVTPLIN	PFIYTLRNEE
	*	*	*	*	**	*****
OLF1	VRDAAEKVLR	SKVDS--S				
OLF2	IKRALRRLLG	KERDSRESWR	AA			
OLF3	VKGAWQKLLW	KFSG-LTSKL	AT			
14-1	VKSAMKQLRQ	RQVF-FT-KS	YT			
14-2	MSALNKGIVG	RK-E-R--KE	EK			
	*	*				

【図 2】

OLF1	MEFTD-RNYT	LVTEFILLGF	PTRPELQIVL	FLMFLTLVAI	ILIGNIGLML	LIRIDPHLQ-
OLF2	M---D--NQS	STPGFLLILGF	SEHPGLGRTE	FVDVITSYLL	TLVGNTLIL	LSALDTKLE-
OLF3	MG-TD--NQT	WVSEFILLGL	SSDWDTRVSL	FVLFLVMYV	TVLGNCLIVL	LIRLDSRLH-
14-3	ME-RI--NST	LLTAFILTGI	PYPLRLRTLF	FVFFFLIYIL	TQLGNLLILI	TVWADPRIHA
	*   *   *   *   *					
OLF1	TPMYFFLSNL	SFVDLCYFSD	IVPKMLVNFL	SENKSISYYG	CALQFYFFCT	FADTESFILA
OLF2	SPMYFFLSNL	SFLDLCTTS	CVPQMLANLW	GPKKTISFLD	CSVQIFIFLS	LGTTECILMK
OLF3	TPMYFFLTNL	SLVDVSYATS	VVPQLLAHFL	AEHKAIPFQS	CAAQLFTSLA	LGGIEFVLLA
14-3	RPMVIFLGVL	SVIDMSISSI	IVPRIMMFT	LGVKPIPFGG	CVAQLYFYHF	LGSTQCFLYT
	*** * *	* *	**	* *	* *	
OLF1	AMAYDRIVAI	CNPLLYTVVM	SRGICMRLIV	LSYLGGNMSS	LVHTSFAFIL	KYCDKNVINH
OLF2	VMAFDRIYAV	COPLHYATII	HPRLCWQLAS	VAWVIGLVGS	VVQTPSTLHL	PFCPDRQVDD
OLF3	VMAYDRIVAV	CDALRYSAIM	HGGLCARLAI	TSWVSGFISS	PVQTAITFQL	PMCRNKFIDH
14-3	LMAYDRYLAI	COPLRYPVLM	TAKLSALLVA	GAWMAGSING	ALQAILTFRL	PYCGPNQVDY
	*** * *	* * *	*	*	*	*
OLF1	FFCDLPPLLK	LSCTDTTINE	WLLSTYGSSV	EIICFILLII	SYFFILLSVL	KIRSFSGRKK
OLF2	FVCEVPALIR	LSCEDTSYNE	IQVAVASVFI	LVVPLSLILV	SYGAIWAVL	RINSATAWRK
OLF3	ISCELLAVVR	LACVDTSNE	VTIMVSSIVL	LMTPLCLVLL	SYIQIISTIL	KIQSREGRKK
14-3	FFCDIPAVLR	LACADTVNE	LVTFDIGVV	VASCFSLILL	SYIQIIQAIL	RIHTADGRRE
	*	* * * *			** * *	*
OLF1	TFSTCASHLT	SVTIYQGTLL	FIYSRPSYLY	SPNTDKIISV	FYTIFIPVLN	PLIYSLRNKD
OLF2	AFGTCSSHLT	VVTLFYSSVI	AVYLOPKNPY	AQGRGKFFGL	FYAVGTPSLN	PLVYTLRNKE
OLF3	AFHTCASHLT	VVALCYGVAI	FTYIQPHSSP	SVLQEKLFVS	FYAILTPMLN	PMIYSLRNKE
14-3	AFSTCGAVT	VVTVYVPCA	FIYLRPETNS	PLD-GAAALV	PTAI-TPFLN	PLIYTLRNOE
	*** * *	*	* *		* * * *	
OLF1	VKDAAEKVL-	-RSKVDSS				
OLF2	IKRALRRLLG	KERDSRESWR	AA			
OLF3	VKGAWQKILW	KFSGL-TSKL	AT			
14-3	VKLAL-KRM-	LRSPTPSEV				
	* *	*				

【図 3】

OLF1	MEFTD-RNYT	-LVTEFILLG	FPTRPELOIV	LFLMFLTLYA	IILIGNIGLM	LLIRIDPHLQ
OLF2	M---DEQS--	S-TPGFILLG	FSEHPGLGRT	LFVDVITSYL	LTLVGNTLII	LLSALDTKLH
OLF3	MG-TDMQT--	-WSEFILLG	LSSDWDTRVS	LFVLFLVMYV	VTVLGNCLIV	LLIRLDSRLH
14-4	MGKTKNTSLD	TVVRDFILLG	LSHPPNIRSL	LFLVFFVIYI	LTQLGNLLIL	LTWADPKLR
14-5	MGKTKNTSLD	AVVTDFILLG	LSHPPNIRSL	LFLVFFIYI	LTQLGNLLIL	LTWADPKLC
	*	*	* ***	**	*	** * *
OLF1	T-PMYFFLSN	LSFVDLCYFS	DIVPKMLVNF	LSENKSISYY	GCAQFYFFC	TFADTESFIL
OLF2	S-PMYFFLSN	LSFLDLCTT	SCVPOMLANL	WGPKKTISFL	DCSVQIFIFL	SLGTTECTLM
OLF3	T-PMYFFLTN	LSLVDVSYAT	SVVPQLLAHF	LAEHKAIPFQ	SCAAQLFFSL	ALGGIEFVLL
14-4	ARPMYILLGV	LSFLDMWLSS	VIVP*IIINF	TPANKAIPFG	GCVAGLYFFH	FLGSTQCFLY
14-5	ARPMYILLGV	LSFLDMWLSS	VTVPRLILDF	TPSIKAIPFG	GCVAGLYFFH	FLGSTQCFLY
	***	*	** *	**	*	*
OLF1	AAMAYDRYVA	ICNPILLYTVV	MSRGICMRLI	VLSYLGGNMS	SLVHTSFAFI	LKYCDKNVIN
OLF2	KVMAFDRYVA	VCQPLHYATI	IHPRLCWOLA	SVAVVIGLVG	SVVQTPSTLH	LPFCPDRQVD
OLF3	AVMAYDRYVA	VCDALRYSAI	MHGGLCARLA	ITSWVSGFIS	SPVOTAITFO	LPMCNRKFID
14-4	TIMAYDRYLA	ICQPLRYPVL	MNGRLCTVLV	AGAWVAGSMH	GSIQATLTFR	LPYCGPNQVD
14-5	TIMAYDRYLA	ICQPLHYVPL	MNGRLCTVLV	AGAWVAGSMH	GSIQATLTFR	LPYCGPNQVD
	** *	** *	*	*	*	*
OLF1	HFFCDLPPLL	KLSCDTDTIN	EWLLSTYGSS	VEIICFIIII	ISYFFILLSV	LKIRSFSGRK
OLF2	DFVCEVPALI	RLSCEDTSYN	EIQVAVASVF	ILVVPLSLIL	VSYGAIWAV	LRINSATAWR
OLF3	HISCELLAVV	RLACVDTSN	EVTIMVSSIV	LLMTPLCLVL	LSYIQIISTT	LKIQSREGRK
14-4	YFICDIPAVL	RLACADTTVN	ELVTFVDIGV	VAASCFLIL	LSYANIVNAI	LKIRTTDGRR
14-5	YFICDIRAVL	RLACADTTVN	ELVTFVDVRV	VAASCFLIL	LSYANIVHAI	LKIRTADGRR
	*	** *	*	*	** *	** *
OLF1	KTFSTCASHL	TSVTIYQGT	LFIYSRPSYL	YSPNTDKIIS	VFYTFIFPVL	NPLIYSLRNK
OLF2	KAFGTCSHL	TVVILFYSSV	IAVYLOPKNP	YAQGRGKFFG	LFYAVGTPSL	NPLVYTLRNK
OLF3	KAFHTCASHL	TVVALCYGVA	IFTYIOPHSS	PSVLOEKLFS	VFYAILTPML	NPMIYSLRNK
14-4	RAFSTCGSHL	IVVTIVYVPC	IFIYLRAGSK	G-PLDG-AAA	VFYTVVTPLL	NPLIYTLRNQ
14-5	RAFSTCGSHL	IVVTIVYVPC	IFIYLRAGSK	D-PLDG-AAA	VFYTVVTPLL	NPLIYTLRNQ
	*	***	*	*	**	* * * * *
OLF1	DVKDAAEKVL	SKVDS--S				
OLF2	EIKRALRRLLG	KERDSRESWR	AA			
OLF3	EVGAWOKLLW	KFSG-LTSKL	AT			
14-4	EVKSAL-KRI-	-TAGQTE				
14-5	EVKSAL-KRI-	-TAG				
	*	*				

【図 4】

```

1  ATGGACAGTC TAAACCAAAC AAGAGTGACT GAATTTGTCT TCTTGGGACT
51  CACTGATAAC CGGGTGCTGG AAATGCTGTT TTTCATGGCA TTCTCAGCCA
101 TTTATATGCT AACGCTTTCA GGGAACATTC TCATCATCAT TGCCACAGTC
151 TTTACTCCAA GTCTCCATAC CCCCATGTAT TTCTTCCTGA GCAATCTGTC
201 CTTTATTGAC ATCTGCCACT CATCTGTCAC TGTGCCTAAG ATGTTGGAGG
251 GTTTGCTTTT AGAAAGAAAG ACCATTTCTT TTGACAACCTG CATCACACAG
301 CTCTTCTTCC TACATCTCTT TGCCTGTGCC GAGATCTTTC TGCTGATCAT
351 TGTGGCGTAT GATCGTTACG TGGCTATCTG CACTCCACTC CACTACCCCA
401 ATGTGATGAA CATGAGAGTC TGTATACAGC TTGTCTTTGC TCTCTGGTTG
451 GGGGGTACTG TTCACTCACT AGGGCAGACC TTCTTGACTA TTCGTCTACC
501 TTACTGTGGC CCCAACATTA TTGACAGCTA CTTCTGTGAT GTGCCTCTTG
551 TTATCAAGCT GGCCTGCACA GATACATACC TCACAGGAAT ACTGATTGTG
601 ACCAATAGTG GAACCATCTC CCTCTCCTGT TTCTTGCCCG TGGTCACCTC
651 CTATATGGTC ATCCTGGTTT CTCTTCGAAA ACACTCAGCT GAAGGGCGCC
701 AGAAAGCCCT GTCTACCTGC TCGGCCCACT TCATGGTGGT TGCCCTCTTC
751 TTTGGGCCAT GTATCTTCAT CTATACTCGG CCAGACACCA GCTTCTCCAT
801 TGACAAGGTG GTGTCTGTCT TCTACACAGT GGTCACCCCT TTGCTGAATC
851 CCTTCATTTA CACCTTGAGG AATGAGGAGG TAAAAAGTGC CATGAAGCAG
901 CTCAGGCAGA GACAAGTTTT TTTCACGAAA TCATATACAT AA

```

【図 5】

1    ATGGAAAGAA TCAACAGCAC ACTGTTGACT GCGTTTATCC TGACAGGAAT  
 51    TCCGTATCCA CTCAGGCTAA GGACACTCTT TTTTGTGTTT TTTTCTCTAA  
 101   TCTACATCCT GACTCAGCTG GGAAACCTGC TTATTTTAAT CACTGTCTGG  
 151   GCAGACCCAA GGCTCCATGC CCGCCCCATG TACATCTTTC TTGGTGTCTT  
 201   CTCAGTCATT GATATGAGCA TCTCCTCCAT CATTGTCCCT CGCCTCATGA  
 251   TGAACCTCAC TTTAGGTGTC AAACCCATCC CATTTGGTGG CTGTGTTGCT  
 301   CAACTCTATT TCTATCACTT CCTGGGCAGC ACCCAGTGCT TCCTCTACAC  
 351   CCTAATGGCC TATGACAGGT ACCTGGCAAT ATGTCAGCCC CTGCGCTACC  
 401   CTGTGCTCAT GACTGCTAAG CTGAGCGCCT TGCTTGTGGC TGGAGCCTGG  
 451   ATGGCAGGAT CCATCCATGG GGCTCTCCAG GCCATCCTAA CCTTCGCGCT  
 501   GCCCTACTGT GGGCCCAATC AGGTGGATTA CTTCTTCTGT GACATCCCTG  
 551   CAGTGTGAG ACTGGCCTGT GCTGACACAA CAGTCAACGA GCTGGTGACG  
 601   TTTGTAGACA TTGGGGTGGT GGTGCGCAGT TGCTTCTCCC TGATCCTCCT  
 651   CTCCTACATA CAGATCATTC AGGCCATCCT GAGAATCCAC ACAGCTGATG  
 701   GGCGGCGCCG GGCTTTTTCA ACTTGTGGAG CCCATGTAAC CGTGGTCACC  
 751   GTGTACTATG TGCCCTGTGC CTTATCTAC CTGAGGCCTG AAACCAACAG  
 801   CCCCTGGAT GGGGCAGCTG CCCTAGTCCC CACGGCCATC ACTCCTTTCC  
 851   TCAACCCCCT TATCTACACT CTGCGGAACC AAGAGGTGAA GCTGGCCCTG  
 901   AAAAGAATGC TCAGAAGCCC AAGAACTCCG AGTGAGGTTT GA

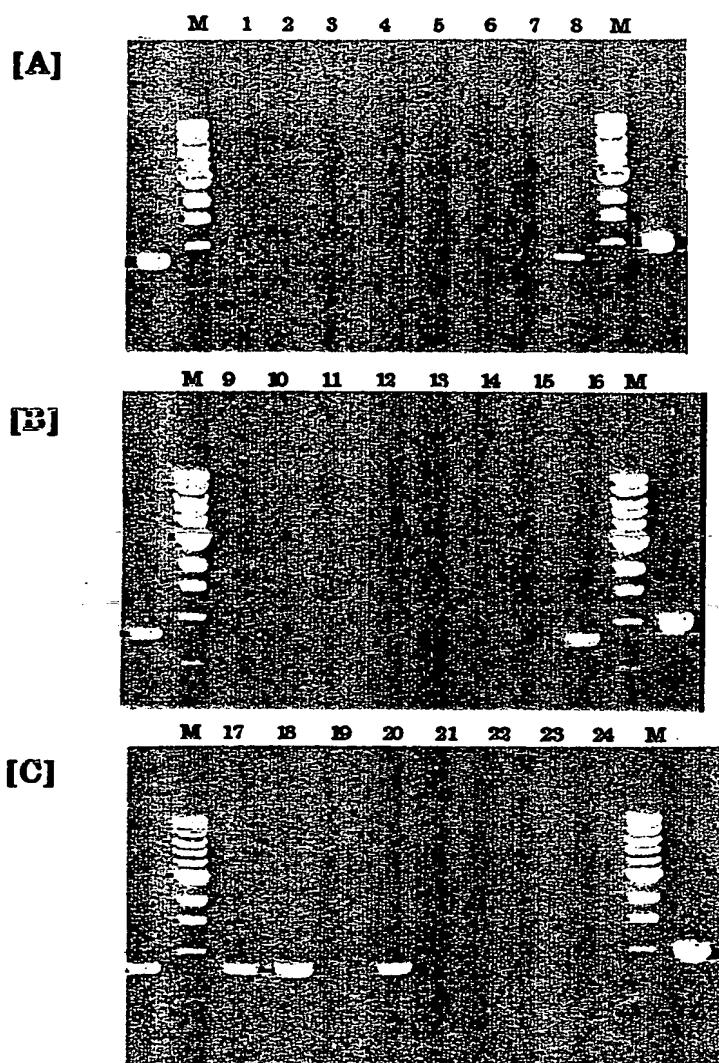
←

【図 6】

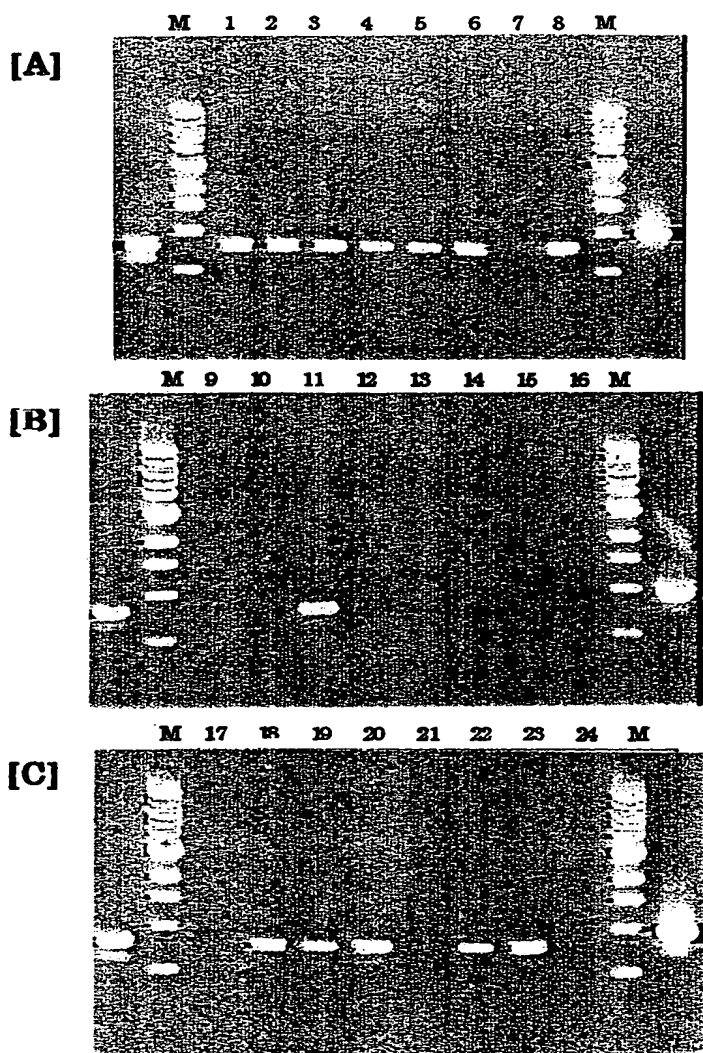
1    ATGGGAAAGA CCAAAAACAC ATCGCTGGAT GCCGTGGTGA CAGATTTTCAT  
 51    TCTTCTGGGT TTGTCTCACC CCCCAAATCT AAGAAGCCTC CTCTTCCTGG  
 101   TCTTCTTCAT CATTTACATC CTCACTCAGC TGGGGAACCT GCTCATTCTG  
 151   CTCACCATGT GGGCTGACCC GAAGCTCTGT GCTCGCCCCA TGTACATTCT  
 201   TCTGGGAGTG CTCTCATTCC TGGACATGTG GCTCTCCTCA GTCACCGTTC  
 251   CTCGGCTTAT TTTGGATTTT ACTCCTTCCA TCAAGGCTAT CCCGTTTGGT  
 301   GGCTGTGTGG CTCAACTGTA TTTCTTTTCAC TTCCTGGGCA GCACCCAGTG  
 351   CTTCTCTAC ACCTTGATGG CCTATGACAG GTACCTAGCA ATATGTCAGC  
 401   CCCTGCACTA CCCAGTGCTC ATGAATGGGA GGTATGCAC AGTCCTTGTG  
 451   GCTGGAGCTT GGGTCGCCGG CTCCATGCAT GGGTCTATCC AGGCCACCTT  
 501   GACCTTCCGC CTGCCCTACT GTGGGCCCAA TCAGGTGGAT TACTTTATCT  
 551   GTGACATCCG CGCAGTATTG AGACTGGCCT GTGCTGACAC AACTGTCAAT  
 601   GAGCTTGTGA CCTTTGTGGA CGTCAGGGTA GTGGCCGCCA GTTGCTTCAT  
 651   GTTAATTCTG CTCTCCTATG CCAACATAGT CCATGCCATC CTGAAGATAC  
 701   GCACCGCTGA TGGGAGGCGC CGGGCCTTCT CCACCTGTGG CTCCACCTA  
 751   ATCGTGGTCA CAGTCTACTA TGTCCCCTGT ATTTTCATCT ACCTTAGGGC  
 801   TGGCTCCAAA GACCCCCTGG ATGGGGCAGC GGCTGTGTTT TACACTGTTG  
 851   TCACTCCATT ACTGAACCCC CTCATCTATA CACTGAGGAA CCAGGAAGTG  
 901   AAGTCTGCCC TGAAGAGGAT AACAGCAGGT TGA

【図 7】

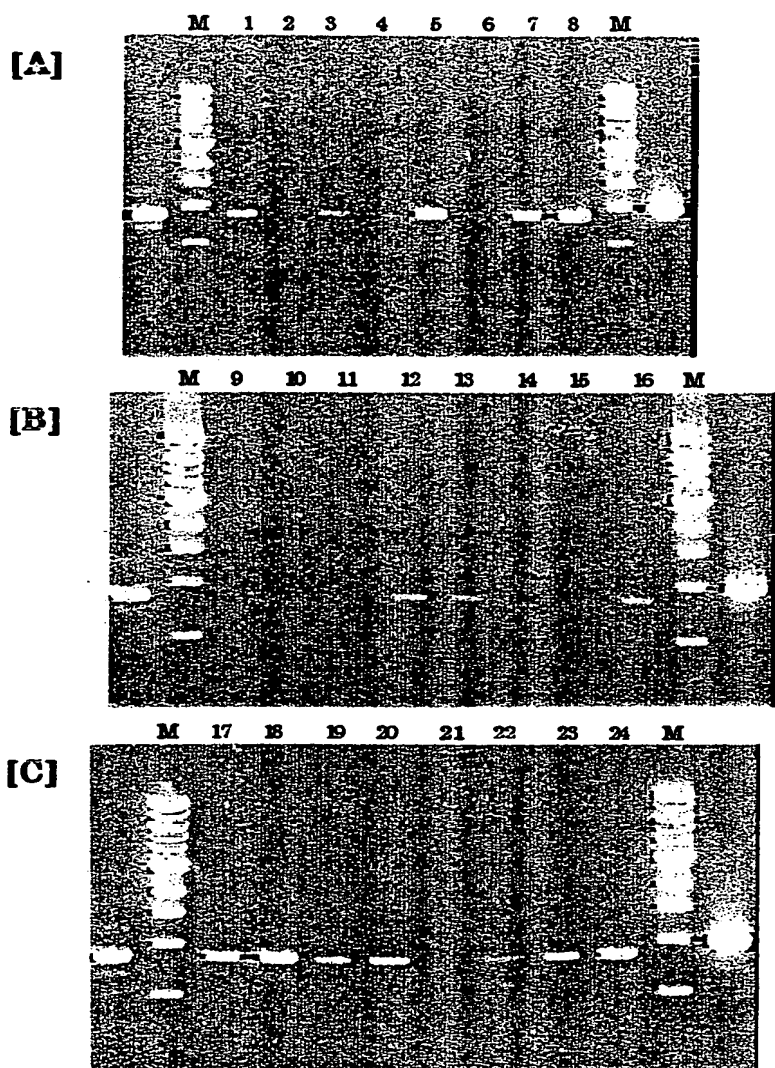




【図 8】



【図9】



【図 10】

1 CTCATTGAATGGACAGTCTAAACCAACAAGAGTGAATTTGTCTTCTGGGACTCA  
MetAspSerLeuAsnGlnThrArgValThrGluPheValPheLeuGlyLeuThr

61 CTGATAACCGGGTGCTGGAAATGCTGTTTTTCATGGCATTCTCAGCCATTTATATGCTAA  
AspAsnArgValLeuGluMetLeuPhePheMetAlaPheSerAlaIleTyrMetLeuThr

TM-I

121 CGCTTTCAGGGAACATTCTCATCATCATTGCCACAGTCTTTACTCCAAGTCTCCATACCC  
LeuSerGlyAsnIleLeuIleIleIleAlaThrValPheThrProSerLeuHisThrPro

181 CCATGTATTTCTTCTGAGCAATCTGTCTTTATTGACATCTGCCACTCATCTGTCACTG  
MetTyrPhePheLeuSerAsnLeuSerPheIleAspIleCysHisSerSerValThrVal

TM-II

241 TGCCTAAGATGTTGGAGGGTTTGCTTTTAGAAAGAAAGACCATTTCCTTTGACAACCTGCA  
ProLysMetLeuGluGlyLeuLeuLeuGluArgLysThrIleSerPheAspAsnCysIle

301 TCACACAGCTCTTCTTCTACATCTCTTTGCCTGTGCCGAGATCTTTCTGCTGATCATTG  
ThrGlnLeuPhePheLeuHisLeuPheAlaCysAlaGluIlePheLeuLeuIleIleVal

TM-III

361 TGGCGTATGATCGTTACGTGGCTATCTGCACTCCACTCCACTACCCCAATGTGATGAACA  
AlaTyrAspArgTyrValAlaIleCysThrProLeuHisTyrProAsnValMetAsnMet

421 TGAGAGTCTGTATACAGCTTGTCTTTGCTCTCTGGTTGGGGGGTACTGTTCACTCACTAG  
ArgValCysIleGlnLeuValPheAlaLeuTrpLeuGlyGlyThrValHisSerLeuGly

TM-IV

481 GGCAGACCTTCTTGACTATTCTGTCTACCTTACTGTGGCCCAACATTATTGACAGCTACT  
GlnThrPheLeuThrIleArgLeuProTyrCysGlyProAsnIleIleAspSerTyrPhe

---

541 TCTGTGATGTGCCTCTTGTTATCAAGCTGGCCTGCACAGATACATACCTCACAGGAATAC  
CysAspValProLeuValIleLysLeuAlaCysThrAspThrTyrLeuThrGlyIleLeu

601 TGATTGTGACCAATAGTGAACCATCTCCCTCTCCTGTTTCTTGGCCGTGGTCACCTCCT  
IleValThrAsnSerGlyThrIleSerLeuSerCysPheLeuAlaValValThrSerTyr

TM-V

661 ATATGGTCATCCTGGTTTCTCTTCGAAAACACTCAGCTGAAGGGCGCCAGAAAGCCCTGT  
MetValIleLeuValSerLeuArgLysHisSerAlaGluGlyArgGlnLysAlaLeuSer

【図 11】

721 CTACCTGCTCGGCCCACTTCATGGTGGTTGCCCTCTTCTTTGGGCCATGTATCTTCATCT  
ThrCysSerAlaHisPheMetValValAlaLeuPhePheGlyProCysIlePheIleTyr  
**TM-VI**

781 ATACTCGGCCAGACACCAGCTTCTCCATTGACAAGGTGGTGTCTGTCTTCTACACAGTGG  
ThrArgProAspThrSerPheSerIleAspLysValValSerValPheTyrThrValVal

841 TCACCCCTTTGCTGAATCCCTTCATTTACACCTTGAGGAATGAGGAGGTAAAAAGTGCCA  
ThrProLeuLeuAsnProPheIleTyrThrLeuArgAsnGluGluValLysSerAlaMet  
**TM-VII**

901 TGAAGCAGCTCAGGCAGAGACAAGTTTTTTTACGAAATCATATACATAATGGGCATTGG  
LysGlnLeuArgGlnArgGlnValPhePheThrLysSerTyrThr\*\*\*

961 GATTGCAGACATAATTGCAGCCACATCCTTAATGAAAGAGCAAAAGTAAAGAGTCAAAAT

1021 CAACTTATATAACTTGGTAAATTAGGTAAATGGCATAGAGCAGGTCAGATTCTGCTCA

1081 TTAAAGATAAGAACTTATTCTGTTCAATTAAGATAAGAACTTATTAACATTATTATAAT

1141 AAA

【図 12】

1    ATTCTCTGGGATATGGAAAGAATCAACAGCACACTGTTGACTGCGTTTATCCTGACAGGA  
      MetGluArgIleAsnSerThrLeuLeuThrAlaPheIleLeuThrGly  
 61    ATTCGGTATCCACTCAGGCTAAGGACACTCTTTTTTGTGTTCTTTTTTCTAATCTACATC  
      IleProTyrProLeuArgLeuArgThrLeuPhePheValPhePhePheLeuIleTyrIle  
 121   CTGACTCAGCTGGGAAACCTGCTTATTTTAATCACTGTCTGGGCAGACCCAAGGCTCCAT  
      LeuThrGlnLeuGlyAsnLeuLeuIleLeuIleThrValTrpAlaAspProArgLeuHis  
      TM-I  
 181   GCCCGCCCCATGTACATCTTTCTTGGTGTCTCTCAGTCATTGATATGAGCATCTCCTCC  
      AlaArgProMetTyrIlePheLeuGlyValLeuSerValIleAspMetSerIleSerSer  
      TM-II  
 241   ATCATTGTCCCTCGCCTCATGATGAACTTCACTTTAGGTGTCAAACCCATCCCATTGGT  
      IleIleValProArgLeuMetMetAsnPheThrLeuGlyValLysProIleProPheGly  
 301   GGCTGTGTTGCTCAACTCTATTTCTATCACTTCCTGGGCAGCACCCAGTGCTTCCTCTAC  
      GlyCysValAlaGlnLeuTyrPheTyrHisPheLeuGlySerThrGlnCysPheLeuTyr  
      TM-III  
 361   ACCCTAATGGCCTATGACAGGTACCTGGCAATATGTGAGCCCCCTGCGCTACCCTGTGCTC  
      ThrLeuMetAlaTyrAspArgTyrLeuAlaIleCysGlnProLeuArgTyrProValLeu  
 421   ATGACTGCTAAGCTGAGCGCCTTGCTTGTGGCTGGAGCCTGGATGGCAGGATCCATCCAT  
      MetThrAlaLysLeuSerAlaLeuLeuValAlaGlyAlaTrpMetAlaGlySerIleHis  
      TM-IV  
 481   GGGGCTCTCCAGGCCATCCTAACCTTCCGCTGCCCTACTGTGGGCCCAATCAGGTGGAT  
      GlyAlaLeuGlnAlaIleLeuThrPheArgLeuProTyrCysGlyProAsnGlnValAsp  
 541   TACTTCTTCTGTGACATCCCTGCAGTGTTGAGACTGGCCTGTGCTGACACAACAGTCAAC  
      TyrPhePheCysAspIleProAlaValLeuArgLeuAlaCysAlaAspThrThrValAsn  
 601   GAGCTGGTGACGTTTGTAGACATTGGGGTGGTGGTTGCCAGTTGCTTCTCCCTGATCCTC  
      GluLeuValThrPheValAspIleGlyValValValAlaSerCysPheSerLeuIleLeu  
      TM-V  
 661   CTCTCCTACATACAGATCATTGAGGCCATCTGAGAATCCACACAGCTGATGGGCGGCGC  
      LeuSerTyrIleGlnIleIleGlnAlaIleLeuArgIleHisThrAlaAspGlyArgArg

【図13】

721 CGGGCTTTTCAACTTGTGGAGCCCATGTAACCGTGGTCACCGTGTACTATGTGCCCTGT  
ArgAlaPheSerThrCysGlyAlaHisValThrValValThrValTyrTyrValProCys

TM-VI

781 GCCTTCATCTACCTGAGGCCTGAAACCAACAGCCCCCTGGATGGGGCAGCTGCCCTAGTC  
AlaPheIleTyrLeuArgProGluThrAsnSerProLeuAspGlyAlaAlaAlaLeuVal

841 CCCACGGCCATCACTCCTTTCCTCAACCCCTTATCTACACTCTGCGGAACCAAGAGGTG  
ProThrAlaIleThrProPheLeuAsnProLeuIleTyrThrLeuArgAsnGlnGluVal

TM-VII

901 AAGCTGGCCCTGAAAAGAATGCTCAGAAGCCCAAGAACTCCGAGTGAGGTTTGAAAGTGT  
LysLeuAlaLeuLysArgMetLeuArgSerProArgThrProSerGluVal\*\*\*

961 CTTTCTCCCACTAGGGAAGCTGCCACAATTAGAATTTATTATAATGTTTAGGCTTCGGTA

1021 ACTTTTTTCTTTTCTTCTGTTTTTCTCTTTTATATAGCCATACTGTATGATCAAACAC

1081 AGTTTAAGGTAAAATACTAACTTTCTAACAGTTCCTTAGTATCCTCTCAAGATAACTCTC

1141 AGCCACTGCAAGAGTAGAGAATGAGACCAAATTCTCACAACTAAACCACATTAAACAAT

1201 CCAGAAGAAAGAATGCAATAGTGTATTTTCCAATGTCTCAGTAATAAA

【図 14】

1 GGCAACCTAAAAGCAAGCATGGACAGTTCCTTGGTGAATAACCAAAAACAAGATGGAGTC  
 61 TCGCTCTGTTGCCAGGCTGGAGTGTAGTGGCGCCATCTCGGCTCGTGCGGTCTCCGCC  
 121 TCCCGGGTTCAGGCGATTCTCCGGCCTCAGCCTCCCGGGTGCCTGGGATTGCAGGAACATA  
 181 GAACTAAAGCGAGGTTAATTTCCACAGTGAGAACATGCTCCAGACATCCGAGCACCAGTG  
 241 TGGCTCTGGAACTCCACAGATACCACAGGACTAGAAAATAACTGGACAATGGGATGTTT  
 301 TATCTTGCCCGAACTGAGGGATATAAAAAGCTCCAAAGACAAAGAAAGTACCATCCACCC  
 361 ATCCCAAAGAAATTATCCTTCTGAAAATAAGACTGCAAAAAGACATGGGAAAGAC  
 MetGlyLysThr  
 421 CAAAAACACATCGCTGGATGCCGTGGTGACAGATTTTATTCTTCTGGGTTGTCTCACCC  
 LysAsnThrSerLeuAspAlaValValThrAspPheIleLeuLeuGlyLeuSerHisPro  
 481 CCCAAATCTAAGAAGCCTCCTCTTCTGGTCTTCTTCATCATTTACATCCTCACTCAGCT  
 ProAsnLeuArgSerLeuLeuPheLeuValPhePheIleIleTyrIleLeuThrGlnLeu  
 TM-I  
 541 GGGGAACCTGCTCATTCTGCTCACCATGTGGGCTGACCCGAAGCTCTGTGCTCGCCCAT  
 GlyAsnLeuLeuIleLeuLeuThrMetTrpAlaAspProLysLeuCysAlaArgProMet  
 601 GTACATTCTTCTGGGAGTGCTCTCATTCTGGACATGTGGCTCTCCTCAGTCACCGTTCC  
 TyrIleLeuLeuGlyValLeuSerPheLeuAspMetTrpLeuSerSerValThrValPro  
 TM-II  
 661 TCGGCTTATTTTGATTTTACTCCTTCCATCAAGGCTATCCCGTTGGTGGCTGTGTGGC  
 ArgLeuIleLeuAspPheThrProSerIleLysAlaIleProPheGlyGlyCysValAla  
 721 TCAACTGTATTTCTTTCACTTCTGGGCAGCACCCAGTGCTTCTCTACACCTTGATGGC  
 GlnLeuTyrPhePheHisPheLeuGlySerThrGlnCysPheLeuTyrThrLeuMetAla  
 TM-III  
 781 CTATGACAGGTACCTAGCAATATGTCAGCCCCTGCACTACCCAGTGCTCATGAATGGGAG  
 TyrAspArgTyrLeuAlaIleCysGlnProLeuHisTyrProValLeuMetAsnGlyArg  
 841 GTTATGCACAGTCCTTGTGGCTGGAGCTTGGGTCGCCGGCTCCATGCATGGGTCTATCCA  
 LeuCysThrValLeuValAlaGlyAlaTrpValAlaGlySerMetHisGlySerIleGln  
 TM-IV  
 901 GGCCACCTTGACCTTCGCCTGCCCTACTGTGGGCCCAATCAGGTGGATTACTTTATCTG  
 AlaThrLeuThrPheArgLeuProTyrCysGlyProAsnGlnValAspTyrPheIleCys

【図 15】



961 TGACATCCGCGCAGTATTGAGACTGGCCTGTGCTGACACAACGTCAATGAGCTTGTGAC  
AspIleArgAlaValLeuArgLeuAlaCysAlaAspThrThrValAsnGluLeuValThr

1021 CTTTGTGGACGTCAGGGTAGTGGCCGCCAGTTGCTTCATGTTAATTCTGCTCTCCTATGC  
PheValAspValArgValValAlaAlaSerCysPheMetLeuIleLeuLeuSerTyrAla

TM-V

1081 CAACATAGTCCATGCCATCCTGAAGATACGCACCGCTGATGGGAGGCGCCGGGCGCTTCTC  
AsnIleValHisAlaIleLeuLysIleArgThrAlaAspGlyArgArgArgAlaPheSer

1141 CACCTGTGGCTCCACCTAATCGTGGTCACAGTCTACTATGTCCCCTGTATTTTCATCTA  
ThrCysGlySerHisLeuIleValValThrValTyrTyrValProCysIlePheIleTyr

TM-VI

1201 CCTTAGGGCTGGCTCCAAAGACCCCTGGATGGGGCAGCGGCTGTGTTTTACACTGTTGT  
LeuArgAlaGlySerLysAspProLeuAspGlyAlaAlaAlaValPheTyrThrValVal

1261 CACTCCATTACTGAACCCCTCATCTATACACTGAGGAACCAGGAAGTGAAGTCTGCCCT  
ThrProLeuLeuAsnProLeuIleTyrThrLeuArgAsnGlnGluValLysSerAlaLeu

TM-VII

1321 GAAGAGGATAACAGCAGGTTGAAGGACTGAATGAAAATAAGTAACTACATCTGCATCATT  
LysArgIleThrAlaGly\*\*\*

1381 ATCACTGCCACTCTCTCAGCTACTGCTGCATGTGACAAATGCCCAATAAA

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なG蛋白質結合型受容体蛋白質およびその遺伝子、それらの製造方法および該製造などに用いられる分子、並びにそれらの用途を提供することを課題とする。

【解決手段】 データベース上に見出された新規なG蛋白質結合型受容体遺伝子を含むヒトゲノム配列をに基づき設計したオリゴヌクレオチドプライマーを利用して、RT-PCRを行い、標的遺伝子の部分cDNA配列を得た。さらに、ヒト精巢由来の cDNA ライブラリーを鋳型とした、5' -RACE 法及び3' -RACE 法を実施することで、これら遺伝子の完全長cDNA を単離することに成功した。単離した遺伝子がコードする蛋白質は、既知のOlfactory 受容体(OR) 遺伝子ファミリーの特徴を有していた。また、その発現特性から免疫応答や造血に関連した機能が示唆された。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 596102791

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2

【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【代理人】 申請人

【識別番号】 100102978

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階  
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階  
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 橋本 一憲

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596102791]

1. 変更年月日 1996年 7月15日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県新治郡新治村永井153番地2

氏 名 株式会社中外分子医学研究所